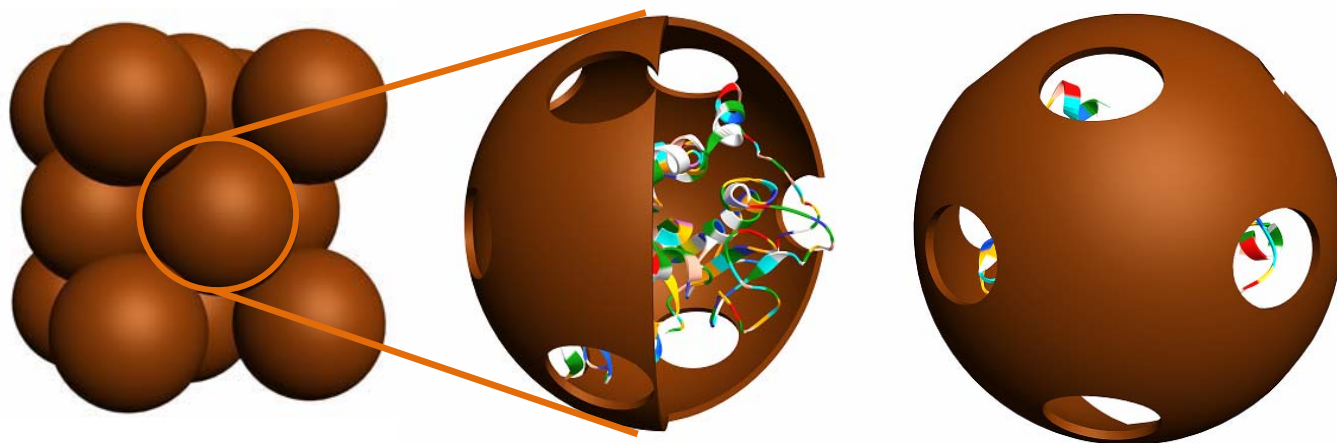


TESIS DOCTORAL

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS

ELÍAS MAXIMILIANO SERRA ALONSO-BARTOL



**Grupo de
Tamices moleculares**



**Instituto de Catálisis y
Petroleoquímica**



**Consejo Superior de
Investigaciones Científicas**



**Universidad autónoma de
Madrid**

Tesis Doctoral

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS

Presentada por

ELÍAS MAXIMILIANO SERRA ALONSO-BARTOL

Dirigida por:

Dra. ISABEL DÍAZ CARRETERO

Dra. ROSA MARÍA BLANCO MARTÍN



**Grupo de
Tamices moleculares**



**Instituto de Catálisis y
Petroleoquímica**



**Consejo Superior de
Investigaciones
Científicas**



**Universidad autónoma de
Madrid**

INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS

“Pero entonces -me atreví a comentar-, aún estáis lejos de la solución...

Estoy muy cerca, pero no sé de cuál.

¿O sea que no tenéis una única respuesta para vuestras preguntas?

Si la tuviera, Adso, enseñaría teología en París.

¿En París siempre tienen la respuesta verdadera?

Nunca, pero están muy seguros de sus errores.

¿Y vos? -dije con infantil impertinencia-. ¿Nunca cometéis errores?

A menudo -respondió-. Pero en lugar de concebir uno solo, imagino muchos, para no convertirme en el esclavo de ninguno”

Umberto Eco(1932 -)

Son muchas las personas responsables de que esta tesis vea finalmente la luz. Como seguro que me dejo a alguien, pido disculpas por anticipado a quien se sienta olvidado.

Empezando por quien ha puesto el dinero, agradezco a la Comunidad de Madrid la concesión de una beca predoctoral FPI, que me permitió comer caliente durante los tres años que duró mi trabajo en el laboratorio. También a las empresas BASF y Novozyme, por la generosa donación de los Pluronic y de los extractos enzimáticos respectivamente.

Al margen de los apoyos oficiales, creo que el primer lugar en estos agradecimientos debe ser para las dos directoras de esta tesis, Rosa e Isabel. Sin su apoyo y su guía, desde el primer día hasta el último, nada de esto habría llegado a buen puerto. Ya sé que todo el mundo dice lo mismo, pero en mi caso es especialmente cierto. Ha habido muchos contratiempos a lo largo de esta tesis, pero su esfuerzo, su paciencia y su tesón han conseguido lo que parecía impensable hace sólo unos meses: lograr que me sentara ante el ordenador y plasmara sobre el papel lo que empecé hace ya más de cinco años.

Pero como una tesis no nace sólo del trabajo de dos o tres personas, también debo dar las gracias a todos aquellos que con su ayuda han puesto su granito de arena. A los Dres. Álvaro Mayoral y Yasuhiro Sakamoto por la elaboración de las reconstrucciones tridimensionales; a la Dra. Teresa Blasco por su colaboración en la obtención de los espectros de RMN; a la Dra. Raquel García por la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de barrido, entre otras cosas; al Dr. José Losada por la preparación y el empleo de los biosensores; y finalmente a la unidad de apoyo del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica y en general a todos los servicios generales del centro, por su excelente labor sin la cual trabajos como éste no serían posibles.

No menos importante en este sentido ha sido el apoyo de toda la gente que me rodea, que siempre ha comprendido que sin su apoyo (e insistencia) no terminaría esto hasta que no fuera abuelo. El apoyo de mis padres y mi hermana, tan dispersos pero tan cercanos. Y especialmente de Marta, que empezó esta tesis como mi novia, ahora es mi mujer y va camino de ser mucho más que eso.

Me acordaré siempre de todos los que me acompañaron en el Instituto de Catálisis y Petroleoquímica durante tres años. Gente que hizo que las tardes se hicieran más llevaderas entre café y café, que convirtió las comidas en catas de vinos y me enseñó que los rusos también lloran. Son tantos que es imposible nombrarlos a todos sin dejarme a alguien: Javi y Ana, Marcelo, Álvaro, Raquel, Sheima, Anita, Ana Belén, Olaf, Vicente, Dimitri, Esther, Javi el gracioso y tantos otros. Difícilmente se me olvidarán incidentes como el de Javi y la mochila perdida, el visionado de

Perdidos en pantalla gigante (sigo sin saber si al final estaban todos muertos o no) o esos momentazos compartidos con Ana Belén antes de salir a la palestra en un congreso.

Dentro del laboratorio del Grupo de Tamices Moleculares encontré una nueva familia, cada uno distinto pero todos igual de acogedores: Joaquín, Quique, Carlos, Isabel, Marisol, Ana, Raquel, Mayte, Isa, Luis y tantos otros que en uno u otro momento pasaron por el mítico laboratorio 105. Sin todos ellos esto habría sido mucho más difícil, y sobre todo muchísimo más aburrido.

And last but not least, I want to say thank you to the Swedish Connection: Viveka, Peter, Gabriel, Alfredo and all the great people I met in Lund; you all made me feel at home during those wonderful six months.

1.- RESUMEN	9
2.- INTRODUCCIÓN	13
2.1.- MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS	16
2.1.1.- <i>Mecanismo general de síntesis</i>	16
2.1.2.- <i>Naturaleza del surfactante</i>	19
2.1.2.1.- MMO preparados con surfactantes catiónicos	20
2.1.2.2.- MMO preparados con surfactantes no iónicos	20
2.1.3.- <i>Consideraciones posteriores</i>	21
2.1.3.1.- Condiciones del tratamiento hidrotermal	22
2.1.3.2.- Mezclas de surfactantes	22
2.1.3.3.- Adición de agentes coestructurantes: trimetilbenceno	22
2.1.3.4.- Empleo de bajas concentraciones de ácido	23
2.1.4.- <i>Materiales Mesoporosos Funcionalizados</i>	24
2.1.5.- <i>Organosílices periódicos mesoporosos</i>	25
2.2.- INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS	28
2.2.1.- <i>Inmovilización de enzimas: aspectos generales</i>	28
2.2.2.- <i>Inmovilización de lipasas</i>	30
2.2.3.- <i>Inmovilización de lipasas en MMO</i>	34
2.2.3.1.- Inmovilización por anclaje	34
2.2.3.2.- Encapsulación o inmovilización in-situ.	36
2.2.4.- <i>Lipasa de Candida antarctica B</i>	38
2.2.5.- <i>Peroxidasa de rábano (HRP): empleo en biosensores</i>	38
2.2.5.1.- Inmovilización de HRP en MMO	40
3.- OBJETIVOS	41
4.- EXPERIMENTAL	45
4.1.- SÍNTESIS DE LOS MMO PARA INMOVILIZACIÓN POST-SÍNTESIS	47
4.1.1.- <i>Materiales mesoporosos ordenados silíceos</i>	47
4.1.1.1.- Sistemas de poro cilíndrico: MCM-41, SBA-15 y KIT-6	48
4.1.1.2.- Sistemas con poros del tipo caja: SBA-16 y FDU-12	49

4.1.2.-	<i>Síntesis de materiales mesoporosos ordenados silíceos metilados por co-condensación</i>	50
4.1.3.-	<i>Síntesis de organosílices periódicos mesoporosos</i>	50
4.2.-	SÍNTESIS DE MMO PARA INMOVILIZACIÓN IN-SITU	51
4.2.1.-	<i>Inmovilización in-situ de lipasa</i>	51
4.2.2.-	<i>Inmovilización in-situ de PPO y HRP</i>	53
4.3.-	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	53
4.3.1.-	<i>Difracción de Rayos X (DRX)</i>	53
4.3.2.-	<i>Isotermas de adsorción de N₂</i>	54
4.3.3.-	<i>Análisis Termogravimétrico (ATG)</i>	55
4.3.4.-	<i>Resonancia Magnética Nuclear de Si²⁹ (RMN)</i>	56
4.3.5.-	<i>Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	56
4.3.6.-	<i>Microscopía electrónica de Barrido (SEM)</i>	56
4.4.-	PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LIPASA	56
4.5.-	MEDIDA DE ACTIVIDAD HACIA LA HIDRÓLISIS DE <i>p</i> -NPA	57
4.6.-	MEDIDA DE ACTIVIDAD HACIA LA HIDRÓLISIS DE ABTS	58
4.7.-	ESTUDIOS DE LIXIVIADO EN MEDIO ACUOSO.	58
4.8.-	MEDIDA DE ACTIVIDAD HACIA LA HIDRÓLISIS DE TRIBUTIRINA	58
4.9.-	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	59
5.-	RESUMEN DE RESULTADOS	61
5.1.-	INMOVILIZACIÓN POST-SÍNTESIS (ARTÍCULOS I-II)	63
5.2.-	INMOVILIZACIÓN IN-SITU (ARTÍCULOS III-V)	70
6.-	CONCLUSIONES	77
7.-	REFERENCIAS	81
8.-	PUBLICACIONES	819

1.- RESUMEN

En esta tesis doctoral se estudia la inmovilización de enzimas en Materiales Mesoporosos Ordenados (MMO). Aunque también se han usado otras enzimas como HRP, PPO o GOX, casi todos los esfuerzos se han dedicado a la lipasa. Se ha inmovilizado esta enzima en distintos tipos de MMO, tratando de discernir la influencia de los parámetros texturales del sólido y la naturaleza química de sus paredes en el proceso. De este modo se ha podido concluir que tanto el tamaño como la forma de los poros (tipo canal o tipo caja y ventana) son fundamentales a la hora de lograr una inmovilización más efectiva. Otros factores como la conectividad de la red porosa no parecen jugar un papel importante. La hidrofobización de las paredes del material sólo parece efectiva si es lo bastante intensa y no va acompañada de una reducción en el tamaño de los canales. Tal es el caso de los Organosílices Periódicos Mesoporosos, que al incorporar los grupos orgánicos dentro del propio esqueleto del material presentan una alta hidrofobicidad y ofrecen los mejores resultados de carga inmovilizada y actividad catalítica de entre todos los MMO probados.

En general, los mejores resultados se obtuvieron con materiales con poros del tipo canal, mientras que los que poseen cajas interconectadas por ventanas de menor tamaño muestran una gran resistencia a la entrada de la enzima, que tiene como contrapartida un lixiviado más limitado una vez inmovilizada.

En una segunda fase, se ha desarrollado una estrategia para inmovilizar la enzima en el interior del MMO durante su propia síntesis (inmovilización *in-situ*). Esto permite aprovechar las ventajas de los poros del tipo caja y ventana superando las limitaciones a la entrada de enzima. Esta estrategia se ha aplicado con éxito a la lipasa, dando lugar a materiales ordenados con una gran cantidad de enzima en su interior, que además se muestra más activa que en los derivados preparados por inmovilización convencional y sufre menos lixiviado en medio acuoso. Finalmente, y de forma preliminar, esta técnica se ha aplicado a otras enzimas (HRP, PPO y GOX) con resultados dispares.

2.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, numerosos campos de la química requieren para su avance el empleo de materiales que aporten, además de otras características, una estructura porosa controlada que permita ejercer una selectividad por tamaños sobre las especies implicadas. Son los llamados tamices moleculares, de creciente importancia en aplicaciones en las que se precisa selectividad por tamaños en el rango de amstrongs (Å) o nanómetros (nm). Ejemplos de aplicaciones susceptibles de demandar materiales de este tipo son los procesos de separación (adsorción), la catálisis, los sensores químicos o la liberación controlada de fármacos.

Para resultar eficientes, los tamices moleculares deben cumplir sobre todo dos requisitos:

- a) Distribución de tamaños de poro estrecha.
- b) Posibilidad de controlar de forma precisa el diámetro de los poros dentro de un rango lo más amplio posible.

Estas características determinan sus aplicaciones como adsorbentes, catalizadores o soportes de especies activas. Por ejemplo, si la distribución de tamaños de un determinado material es muy ancha no resultará eficiente como adsorbente, pues la selectividad por tamaños será reducida. Por otro lado, es evidente que distintas aplicaciones requieren distintos tamaños de poro en función de las especies implicadas, que pueden ir desde moléculas formadas por unos pocos átomos a macromoléculas biológicas de varios nanómetros de diámetro. Es por ello que uno de los factores más importantes es el rango de tamaños de poro alcanzables. Basándose en este factor, la IUPAC establece una clasificación que divide los materiales porosos en tres tipos:

- a) Microporosos: poros inferiores a 2 nm.
- b) Mesoporosos: poros entre 2 y 50 nm.
- c) Macroporosos: poros superiores a 50 nm de diámetro.

Sin duda una de las familias de materiales porosos más importantes académica e industrialmente son las zeolitas y los zeotipos. Se trata de aluminosilicatos cristalinos microporosos de estructura tridimensional, con amplia aplicación en campos tan diversos como la petroquímica, procesos de intercambio iónico, separación de gases, etc¹. Sin embargo, el reducido tamaño de poro de estos materiales (generalmente

inferior a 1,2 nm) supone una importante limitación para la difusión de moléculas voluminosas, involucradas en procesos tan importantes como el craqueo de gasoil de vacío u otros en química fina o industria farmacéutica, donde necesariamente se requiere porosidad en el rango del mesoporo^{1,2}. Hasta 1992 la mayoría de los materiales mesoporosos inorgánicos de que se disponía eran sólidos amorfos con distribución de diámetros relativamente ancha, y por tanto dudosa aplicabilidad en procesos en los que se requiera elevada selectividad por tamaños.

2.1.- MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS

Es en ese año cuando un grupo de investigadores de la empresa Mobil Oil publicó una ruta de síntesis que conducía a una familia de Materiales Mesoporosos Ordenados (MMO) que fue bautizada y patentada con el nombre M41S³. Estos silicatos y aluminosilicatos se caracterizan por poseer un sistema poroso ordenado con una estrecha distribución de diámetros en el rango del mesoporo, acompañados de elevada área superficial y volumen de poro. Cumplen, por tanto, con los requisitos que señalábamos al comienzo de esta sección.

En realidad, dos años antes de esa fecha (1990) un grupo de científicos japoneses ya habían dado con una vía que conducía a un MMO, bautizado como FSM-16. La ruta de síntesis descrita implicaba el plegamiento de un silicato laminar (kanemita) que actuaba como precursor^{4,5}. Sin embargo con el tiempo esta ruta se ha abandonado, pues no es generalizable a otros tipos de estructuras, mientras que han sido los mecanismos que precinden del intermedio laminar los que han centrado la atención de la comunidad científica.

2.1.1.- Mecanismo general de síntesis

La síntesis de los materiales de la familia M41S supone un importante salto en el concepto de agente director de estructura (ADE), que pasa de ser una molécula orgánica (en zeolitas y zeotipos) a un agregado de moléculas anfifílicas.

Un surfactante o tensioactivo es una molécula con un grupo hidrofóbico (cola apolar) y uno o más grupos hidrofílicos (cabezas polares). Estas moléculas se caracterizan por agregarse formando micelas esféricas cuando en disolución acuosa se

supera una concentración denominada concentración micelar crítica (*cmc*) y siempre que se esté por encima de la temperatura de Kraft. Así se minimiza el contacto de las colas apolares (que quedan protegidas en el núcleo de la micela) con el medio exterior acuoso, hacia el que se orientan las cabezas polares. A concentraciones más elevadas, algunos tensioactivos evolucionan hacia grados superiores de ordenación, en los que a su vez las micelas se deforman y asocian generando supraestructuras a las que se denomina *cristales líquidos*. Éstos pueden adquirir muy diversas simetrías en función de factores como la concentración, la temperatura y la naturaleza específica de la molécula anfifílica. Los distintos tipos de surfactantes que se pueden utilizar para sintetizar MMO se abordarán en la siguiente sección.

En cualquier caso, el procedimiento de síntesis de estos MMO se basa en la técnica sol-gel diluida. En un principio, se postularon dos mecanismos de síntesis contrapuestos:

- a) Auténtico cristal líquido como plantilla (*true liquid-crystal template*): este mecanismo postula que el surfactante, sometido a altas concentraciones en medio acuoso, forma un cristal líquido ordenado como los indicados más arriba. Sobre este cristal líquido se añaden los precursores silíceos, que polimerizan a su alrededor y reproducen su estructura⁶. La posterior eliminación del surfactante daría lugar a un sólido poroso que es el negativo del cristal líquido inicial. Como los surfactantes pueden formar multitud de fases ordenadas distintas modificando su concentración y temperatura, el campo de estructuras posibles para los sólidos finales es muy amplio.
- b) Auto ensamblaje cooperativo: en esta vía el surfactante no forma un cristal líquido por sí solo, sino que es la interacción entre las especies silíceas y las moléculas anfifílicas la que conduce al material híbrido a formar una estructura ordenada, de la que se extrae el surfactante para obtener un sólido hueco con simetría definida^{7,8}.

Aunque en teoría ambas vías son posibles, las síntesis habituales emplean concentraciones de surfactante muy por debajo de las que serían necesarias para formar un cristal líquido, por lo que el mecanismo cooperativo es el más defendido. La auténtica naturaleza de este ensamblaje se ha estudiado de forma intensa mediante

técnicas *in-situ*, formulándose varios mecanismos como el ensamblaje en supraestructuras de cilindros formados por la condensación de unas pocas monocapas de precursores silíceos alrededor de micelas progresivamente elongadas^{9,10}. Sin embargo tales teorías no son relevantes para los objetivos de esta tesis.

Para comenzar la síntesis de un MMO basta con preparar una disolución del surfactante escogido a una concentración y temperatura que lo sitúen en la región micelar dentro del diagrama de fases. Como se comprobó muy pronto no es necesario acudir a regiones en las que el tensioactivo forme cristales líquidos, pues tal como se trató en la sección anterior, el autoensamblaje hace que no sea necesaria una auténtica fase ordenada que actúe como plantilla. En último término, el factor que determina el tipo de fase obtenida es el parámetro de empaquetamiento del surfactante, g , que es una medida de la curvatura de las micelas que se formarán, y que viene dado por la fórmula:

$$g = \frac{V}{a} \cdot l, \quad \text{con: } \begin{cases} V: \text{volumen de la cola apolar del surfactante} \\ a: \text{área efectiva de la cabeza polar del surfactante} \\ l: \text{longitud de la cola apolar del surfactante} \end{cases}$$

Así, y de forma general, valores de g menores a $1/3$ tienden a conducir a fases tridimensionales cúbicas o hexagonales, valores entre $1/3$ y $1/2$ conducen a la fase hexagonal plana, mientras que cuando g es mayor que $1/2$ suelen obtenerse fases laminares. Estos datos son sólo orientativos, pues la auténtica naturaleza del material final viene afectada por muchos otros factores como la concentración y temperatura del surfactante o el empleo de aditivos o coestructurantes.

En términos generales, para la síntesis de un MMO la disolución micelar se lleva al pH deseado (ácido o básico dependiendo de la naturaleza del surfactante) y tras un tiempo de equilibrado se añade el precursor de silicio, generalmente un alcóxido, que suele ser tetraetilortosilicato (TEOS) o tetrametilortosilicato (TMOS) en la mayoría de los casos. Tras un periodo de tiempo variable, durante el cual se produce un precipitado blanco que es ya el precursor de nuestro MMO, se introduce la muestra en autoclaves y se somete a un tratamiento hidrotermal que suele desarrollarse en torno a 100°C por un tiempo variable, normalmente no inferior a 24 horas. Esto promueve la condensación del óxido de silicio en las paredes, reduciendo el número de silanoles (especies sin condensar Si-OH) y mejorando la calidad del material en general, su estabilidad hidrotermal y su grado de ordenamiento. Una vez filtrado y secado, el polvo blanco

obtenido se somete a una calcinación a alta temperatura bajo una corriente de aire, con el objetivo de eliminar el surfactante del interior y obtener finalmente un material ordenado y poroso.

Sin embargo, las paredes de los MMOs así preparados son de naturaleza amorfa y carecen del ordenamiento cristalino típico de los materiales zeolíticos. Esto hace que tanto la superficie de los poros como las paredes internas estén repletas de defectos estructurales, formados por grupos silanol que no han condensado durante el tratamiento térmico. La presencia de estos grupos permite la sencilla funcionalización de los MMO con una gran variedad de grupos funcionales, que será abordada más adelante. Sin embargo, la mayoría de estos defectos condensan durante el proceso de calcinación, lo que genera una pequeña contracción en el tamaño de la celda unidad.

2.1.2.- Naturaleza del surfactante

Hay cuatro tipos distintos de surfactantes que conducen a MMO, clasificados según su naturaleza polar. Cada uno de ellos dispone de su propio diagrama de fases, que permite estudiar en que región de temperatura y concentración debemos situarnos para obtener la fase buscada:

- a) Surfactantes catiónicos: la cabeza polar tiene una carga positiva, generalmente un grupo alquilamonio, mientras que la cola apolar suele ser una cadena hidrocarbonada larga de longitud variable.
- b) Neutros: la cabeza polar es un grupo amino, que puede o no protonarse (cargándose positivamente) en función de las condiciones del medio, mientras que la cola apolar sigue siendo una cadena hidrocarbonada larga.
- c) No iónicos: tanto las secciones polares como las apolares de este tipo de surfactantes son neutras y no ionizables en condiciones normales. Generalmente la cabeza polar está formada generalmente por una o dos cadenas de polióxido de etileno, mientras que la cola puede ser una cadena alifática, una cadena alquilarómica o, en la mayoría de los casos que nos ocuparán, una cadena de polióxido de polipropileno. Este último tipo de surfactantes, conocidos como copolímeros de tres bloques o Pluronic (su nombre comercial), serán los más utilizados en este trabajo.

- d) Aniónicos: la cabeza polar es un grupo con carga negativa (fosfato, sulfato, etc.) y la cola es de nuevo una larga cadena hidrocarbonada.

Aunque se han sintetizado MMO con las cuatro categorías de surfactantes, los que han concentrado casi todos los esfuerzos son los de tipo catiónico y los de tipo no iónico. Ambos tipos se han empleado en este trabajo.

2.1.2.1.- MMO preparados con surfactantes catiónicos

En el caso de la familia M41S, se utilizan surfactantes catiónicos de tipo alquiltrimetilamonio, como el bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB). Dentro del grupo, el material más estudiado y utilizado es el MCM-41 (siglas derivadas del acrónimo *Mobile Composition of Matter*), formado por un empaquetamiento de canales unidireccionales en geometría hexagonal que satisfacen la simetría impuesta por el grupo plano $p6mm$. Posee áreas superficiales próximas a los $1000 \text{ m}^2/\text{g}$, volúmenes de poro mayores a $0.8 \text{ cm}^3/\text{g}$ y un diámetro muy uniforme y fácilmente ajustable entre 1,5 y 10 nm, aunque típicamente en torno a 4 nm. Aunque la fase más común y estable a concentraciones bajas es la hexagonal, distintas condiciones de síntesis permiten obtener otras simetrías, como es el caso de la red tridimensional cúbica bicontinua $Ia3d$ (MCM-48) o la fase laminar MCM-50.

2.1.2.2.- MMO preparados con surfactantes no iónicos

Pese a la preponderancia de los materiales de la familia M41S durante los primeros años, estos aún seguían presentando algunas carencias de cara a algunas aplicaciones potenciales. Sus tamaños de poro raramente pasaban de unos 5 nm, lo que los hacía demasiado pequeños para aplicaciones en las que la red porosa debe actuar como huésped de macromoléculas (como son las enzimas). Además, debido al pequeño grosor de las paredes silíceas la estabilidad hidrotérmica de estos materiales es reducida. En los años siguientes, fueron muchos los intentos de sintetizar MMO empleando la amplia gama de surfactantes disponibles, muchos de ellos con éxito.

En 1998, un grupo de investigadores de la Universidad de Santa Barbara liderado por el profesor G. D. Stucky logró sintetizar MMO en medio fuertemente ácido utilizando, entre otros, surfactantes del ya mencionado grupo de los copolímeros de tres

bloques o Pluronic¹¹. Se trata de tensioactivos no iónicos formados por un fragmento central de óxido de polipropileno (OPP) que actúa como cola apolar y dos cadenas laterales de óxido de polietileno (OPE) que actúan como cabezas polares. De entre ellos, el más utilizado es el de nombre comercial P123, que responde a la fórmula genérica (OPE)₂₀(OPP)₇₀(OPE)₂₀.

Dentro de los materiales denominados SBA (siglas derivadas de la universidad de procedencia, *Santa Barbara University*), el caso más representativo es el SBA-15, análogo del MCM-41 sintetizado con el pluronic P123¹². Se trata de materiales con paredes de óxido de silicio de hasta 60 Å, lo que las hace considerablemente más gruesas que los del grupo M41S y les confiere mayor estabilidad hidrotermal. Además (y lo que es mucho más importante en nuestro caso) presentan mayores tamaños de poro, típicamente en torno a 9 nm en el caso de la SBA-15, aunque en teoría puede ampliarse hasta 30 nm. Otro ejemplo importante de esta serie es el SBA-16, preparado con el Pluronic F127 ((OPE)₁₀₆(OPP)₇₀(OPE)₁₀₆). Se trata de un material cúbico de simetría $Im\bar{3}m$ que tiene la particularidad de presentar un sistema de poros del tipo caja y ventana, con grandes cavidades conectadas entre sí por aberturas de menor tamaño, que se disponen en estructura cúbica centrada en el cuerpo¹¹.

2.1.3.- Consideraciones posteriores

Estos dos grupos de materiales son los más importantes dentro del mundo de los MMO y constituyen el punto de partida de la mayoría de los desarrollos posteriores. Con el tiempo la investigación en este campo se ha desarrollado y ramificado siguiendo diversos caminos, alcanzándose un considerable grado de refinamiento que continuamente lleva al hallazgo de nuevas estructuras y a un mejor control de las propiedades de los materiales.

El tamaño de poro sigue siendo el principal escollo que obstaculiza el uso como soportes de enzimas de los materiales descritos hasta el momento. Así, la muestra SBA-16 sintetizada originalmente (la de mayor tamaño de poro hasta ese momento) estaba formada por cajas de tamaño relativamente reducido (5.4 nm)¹¹, lo que unido a la dimensión bastante menor de las ventanas que las interconectaban entre sí hacía difícil su aplicación como soporte enzimático. Afortunadamente, con el tiempo se han desarrollado estrategias que permiten expandir y controlar de forma precisa ambos

parámetros de forma independiente. A continuación reseñamos algunos de los avances más relevantes en esta dirección.

2.1.3.1.- Condiciones del tratamiento hidrotermal

Aumentando la temperatura (hasta unos 150°C) y la duración del tratamiento hidrotermal de materiales con poros del tipo caja (como el SBA-16) se consiguen mayores diámetros de ventana^{13,14,15}. En el caso extremo ambos diámetros llegan a igualarse, produciéndose una transición a estructuras de poro cilíndrico.

2.1.3.2.- Mezclas de surfactantes

El empleo de mezclas de varios surfactantes de la misma familia puede ser visto simplemente como la obtención de un promedio entre sus parámetros de empaquetamientos. En la práctica, las mezclas de surfactantes permiten afinar la síntesis y mejorar la calidad de los materiales finales.

La aplicación más representativa de esta técnica consiste en añadir al F127 empleado en la síntesis tradicional de SBA-16 proporciones crecientes de P123. Combinando esta técnica con la señalada en el punto anterior (aumento de temperatura y tiempo del tratamiento hidrotermal) el resultado global es el hinchado de las cajas hasta tamaños que pueden llegar a los 9-20 nm¹⁶. De este modo, combinando ambas técnicas se pueden modular ambas dimensiones de forma muy precisa e independiente.

2.1.3.3.- Adición de agentes coestructurantes: trimetilbenceno

La adición de agentes orgánicos a una disolución acuosa de un tensioactivo afecta de forma muy sensible a la geometría de la fase, y de esta forma a la naturaleza del material final. Por ejemplo, moléculas fuertemente hidrofóbicas como el trimetilbenceno (TMB) alcanzan la región interna (la más hidrofóbica) de las micelas, provocando su hinchado. Esto se traduce en un cambio en el parámetro de empaquetamiento, lo que según las condiciones (concentración de TMB, estabilidad de la fase etc.) puede conducir bien a un cambio de fase, bien a un aumento de tamaño de las cavidades del material final.

Ésta es la técnica utilizada por, entre otros, el grupo del profesor D. Zhao, de la *Fudan University*, desarrollando una nueva batería de materiales bajo las siglas FDU. Los agentes directores empleados son generalmente copolímeros de tres bloques. Así se llega, por ejemplo, al material FDU-12, sintetizado empleando el pluronic F127¹⁵. Mediante la adición de sales y de trimetilbenceno (TMB) se provoca una transformación de fase, pasando de una simetría $Im3m$ a otra $Fm3m$. Se trata, al igual que la SBA-16, de una estructura formada por cajas, pero esta vez en disposición cúbica centrada en las caras en lugar de en el cuerpo, es decir una red con un empaquetamiento más compacto y mayor conectividad. Además, tanto el tamaño de las cajas como el de las ventanas es mayor que en la SBA-16. Estas características llevaron a que, ya en el propio artículo en que se describía su síntesis, se remarcara su enorme potencial como soporte de enzimas inmovilizadas, mostrando un comportamiento mucho más ventajoso en la adsorción de lisozima que la SBA-16. Además, como en el caso de este último material, la modificación de las condiciones en el tratamiento hidrotermal (temperatura y tiempo) permiten variar las propiedades texturales del sólido.

2.1.3.4.- Empleo de bajas concentraciones de ácido

Otro grupo de MMO con propiedades interesantes es el de la serie KIT, desarrollada por el grupo del profesor R. Ryoo en el *Korean Institute of Technology*. La síntesis de este tipo de materiales se basa en el empleo de concentraciones de ácido menores a las habituales (generalmente en torno a 0,5 M, aunque puede reducirse en algunos casos hasta 0,1 M). Esto ralentiza la cinética de formación de la mesofase, permitiendo un mejor control global del proceso. De especial interés en nuestro caso es la KIT-6, preparada con el surfactante P123¹⁷. Gracias al empleo de butanol y KCl se obtiene una fase cúbica bicontinua $Ia3d$, análoga del MCM-48 pero con tamaños de poro mayores y un rango de condiciones de síntesis mucho más amplio. La obtención de este tipo de fases es especialmente problemática y suele conducir a materiales de pequeño tamaño de poro, como es el caso del MCM-48³, o bien presentan distorsiones estructurales, como en el FDU-5¹⁸. El KIT-6, sin embargo, es reproducible en un amplio rango de condiciones, y presenta elevados tamaños de poro que pueden llegar hasta los 12 nm (aunque se mantienen generalmente en torno a 8) y que se pueden controlar mediante simples variaciones en el proceso. Las ventajosas características de conectividad de este

material, con una red tridimensional muy abierta y la presencia simultánea de dos sistemas de canales no conectados entre sí, lo hacen un candidato idóneo para la inmovilización de enzimas.

2.1.4.- Materiales Mesoporosos Funcionalizados

Aunque las aplicaciones potenciales de los MMO son muy variadas, uno de los principales objetivos que tenían en mente los primeros grupos que desarrollaron los MMO era su aplicación en la industria del refino, en procesos de craqueo catalítico para el procesamiento de hidrocarburos voluminosos. Mediante el ensanchamiento del tamaño de poro el primer obstáculo estaba salvado, pues las moléculas ya podían difundir a través de sus canales. Sin embargo, existe otro importante escollo: debido a la falta de cristalinidad intrínseca de las paredes de sílice amorfa, su actividad catalítica es mucho menor que la de las zeolitas. Este hecho, unido a la menor estabilidad hidrotérmica, hace que las aplicaciones prácticas a día de hoy sean aún escasas.

Una posibilidad que fue explorada muy pronto para paliar esta falta de actividad es la funcionalización del material. Esta técnica permite recubrir las paredes internas con una gran variedad de grupos orgánicos que le confieran una propiedad particular, por ejemplo algún tipo de reactividad o afinidad por determinados sustratos. Esta modificación se puede hacer de dos maneras:

- a. Anclaje post-síntesis: se basa en anclar el grupo activo una vez el MMO ha sido sintetizado y el surfactante eliminado. Generalmente esto se lleva a cabo mediante sililación, es decir por reacción de los grupos silanol con moléculas precursoras de grupos funcionales. Esta ruta logra preservar la estructura ordenada. Sin embargo ofrece una distribución menos homogénea de las especies ancladas, que pueden situarse en un gran porcentaje cerca de la boca de los poros o en la propia superficie¹⁹. Además demanda más tiempo que el método de co-condensación, al añadir una etapa adicional al proceso.
- b. Funcionalización por co-condensación o *in-situ*: consiste en la condensación simultánea del tetraalcoxisilano con un organosilano precursor del grupo funcional deseado²⁰. Este método elimina un paso del proceso, y parece que permite un mejor control de la cantidad de grupos orgánicos incorporados,

logrando además una distribución más homogénea¹⁹. Sin embargo tampoco carece de inconvenientes. Las diferentes geometrías y velocidades de reacción entre el tetraalcoxisilano y el organosilano hacen que sea difícil garantizar la presencia de la totalidad de los grupos funcionales en la superficie, además de distorsionar la estructura del MMO. Generalmente el grado de ordenamiento decrece al aumentar el porcentaje de organosilanos, hasta el punto de volverlo desordenado o generar transformaciones de fase cuando su presencia excede un valor crítico.

Con este tipo de estrategias de síntesis la eliminación del surfactante debe hacerse por extracción, ya que la calcinación destruiría la función orgánica. En los materiales preparados con surfactantes catiónicos (como los de la serie M41S) ésta se hace con una mezcla Etanol/HCl. Cuando el surfactante es del tipo no iónico, como los Pluronic, la interacción del tensioactivo con la red silícea es más débil, por lo que se puede prescindir del ácido¹¹. Con todo, su presencia suele mejorar la rapidez y el rendimiento del proceso.

En el presente trabajo se ha elegido el método de funcionalización por co-condensación de TEOS y metil-trietoxisilano (MTEOS) para generar MMO tapizados con pequeños porcentajes de grupos metilo, que confieran a las paredes una cierta naturaleza hidrofóbica. El procedimiento se esquematiza en la figura 1.

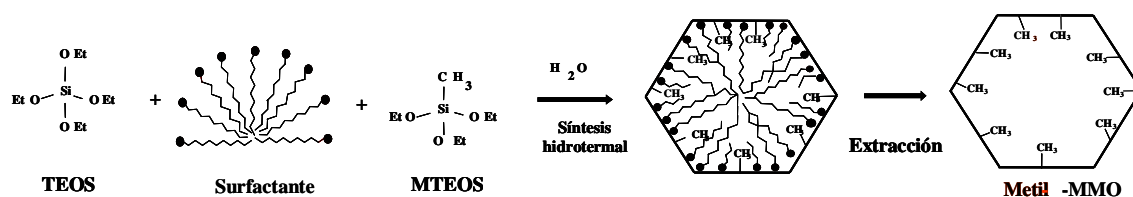


Figura 1: Funcionalización por co-condensación de MMO con grupos metilo.

2.1.5.- Organosílices periódicos mesoporosos

Una tercera vía para obtener materiales híbridos orgánico-inorgánicos son los organosílices periódicos mesoporosos (OPM). En este caso, la fuente de sílice es un precursor con dos átomos de silicio del tipo $(\text{R}'\text{O})_3\text{Si}-\text{R}-\text{Si}(\text{OR}')_3$, que condensa formando una red silícea en la que el grupo orgánico está integrado en la estructura del sólido. Los precursores pueden obtenerse con una amplia variedad de grupos orgánicos

actuando como puente entre los dos átomos de silicio, lo que permite modificar propiedades del material final como la porosidad, la estabilidad térmica o química o la hidrofobicidad del material.

Las diferencias entre este tipo de materiales y los MMO funcionalizados son notables. Mientras que en estos últimos la función orgánica está anclada de forma terminal y orientada hacia el interior del poro, en los OPM forma parte de la propia pared. Además, mientras que los MMO funcionalizados preparados por co-condensación admiten un máximo del 20-25% de precursor orgánico si se desea obtener grados aceptables de ordenamiento (debiendo añadirse TEOS o TMOS para completar el gel de síntesis), los PMO pueden ser sintetizados utilizando organosílices bisililados como único precursor sin que la estructura de la red porosa se resienta²¹.

La síntesis de PMOs se documentó por primera vez en 1999, siendo publicada de forma simultánea por parte de tres grupos^{22,23,24}. En el primero de ellos Inagaki y sus colaboradores usaron un 100% de 1,2-bis(trimethoxysilyl)ethane como precursor y cloruro de octadeciltrimetil amonio como surfactante²³. El resultado son materiales híbridos orgánico-inorgánicos muy ordenados y con fases hexagonales bi- o tridimensionales, dependiendo de las condiciones concretas de la síntesis.

En la figura 2 se muestran esquemáticamente las tres maneras de obtener MMO híbridos: funcionalización post-síntesis o por co-condensación o síntesis directa de OPMs:

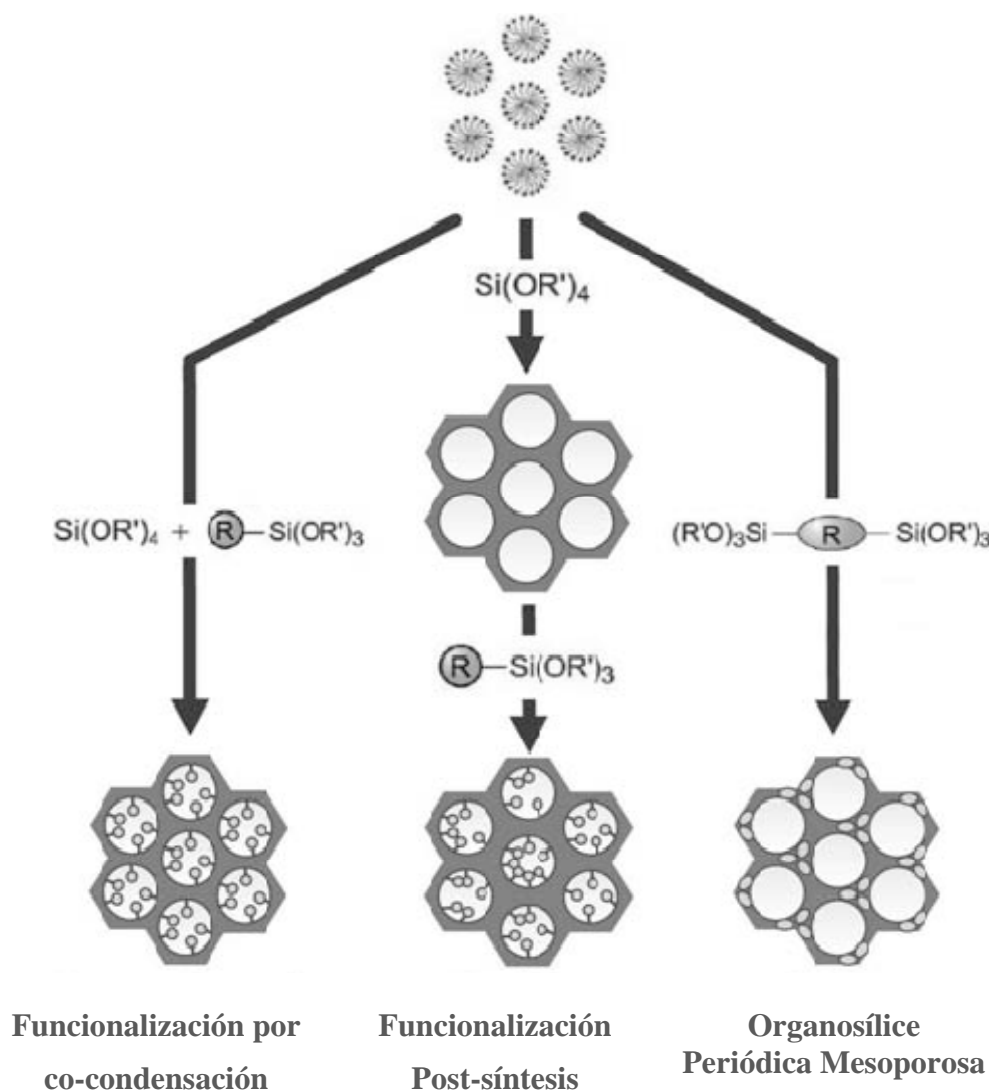


Figura 2: los tres métodos para sintetizar MMO híbridos orgánico-inorgánicos.

En todos esos casos y en las primeras publicaciones que siguieron este camino, se utilizaron los surfactantes catiónicos en medio básico como agentes directores de estructura. Esta ruta conduce a materiales estables y ordenados, pero cuyo tamaño de poro no supera los 5 nm, tal y como había ocurrido antes con los MMO. De igual modo, el uso de surfactantes neutros del tipo de los Pluronic en medio ácido conduce a materiales con poros de hasta 10 nm^{25,26}.

La concentración de ácido puede reducirse, aunque esto hace que el rango de condiciones a las que se puede trabajar sea estrecho, haciendo las síntesis poco reproducibles^{27,28}. La adición de sales, además de mejorar el grado de orden al fomentar la interacción entre el surfactante y la sílice, puede conducir a una morfología en forma

de varilla, señalada en varias ocasiones como idónea para promover la inmovilización de enzimas^{29,30}. También es posible sintetizar OPMs con poros del tipo caja y ventana empleando el surfactante F127, que conduce a estructuras tipo SBA-16 y tamaños de caja y ventana similares³¹.

Aunque la variedad de posibles precursores es muy amplia, los dos más empleados son los que utilizan un grupo $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2$ como puente entre los átomos de silicio: bis(trimethoxysilyl)ethane (BTME) y bis(triethoxysilyl)ethane. Esto se debe a su fácil disponibilidad y a la similitud de su comportamiento con respecto a los precursores más comunes en la síntesis de MMO convencionales. Aunque este grupo es poco activo químicamente y tiene pocas aplicaciones directas interesantes en el campo de la catálisis, puede aportar un alto grado de hidrofobicidad a las paredes del material, lo que lo convierte en un interesante candidato para la inmovilización de especies hidrofóbicas en el interior de su red porosa. De hecho su capacidad como soporte de enzimas ya ha sido explorada^{29,32}, aunque los resultados no mejoran los obtenidos con sus análogos silíceos. Estos pobres resultados se deben, probablemente, al empleo de enzimas en las que prima la atracción electrostática sobre la hidrofóbica, además de al menor tamaño de poro en la segunda de las referencias.

2.2.- INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN MATERIALES MESOPOROSOS ORDENADOS

El objetivo de este trabajo es estudiar la inmovilización de varias enzimas (fundamentalmente la lipasa) en los MMO descritos en las secciones anteriores. Para avanzar hacia ese objetivo comenzaremos describiendo los aspectos generales de la inmovilización de enzimas en soportes sólidos.

2.2.1.- Inmovilización de enzimas: aspectos generales

Las enzimas son catalizadores biológicos de origen proteico (biocatalizadores) que presentan varias ventajas sobre sus parientes sintéticos: altas especificidad y selectividad y, en general, una mayor actividad en medios de reacción suaves. Sin embargo su uso en aplicaciones industriales no siempre resulta sencillo de implementar: a menudo se desnaturalizan total o parcialmente (con la consiguiente pérdida de

actividad) en presencia de disolventes orgánicos, de uso muy común en las que serían sus potenciales aplicaciones, o al someterse a temperaturas elevadas o medios agresivos (por ejemplo con pHs lejano a la neutralidad). Además, por ser las proteínas solubles en medio acuoso, su separación del medio de reacción (imprescindible para que un catalizador sea comercialmente viable) es cara y complicada. La forma más aceptada de sortear estos obstáculos es la inmovilización de las biomoléculas en un medio insoluble en el medio de reacción, generalmente una estructura sólida.

Los beneficios potenciales de esta técnica son muchos. El más evidente es la simplificación del proceso de reciclado del catalizador, que puede separarse del mismo por un simple proceso de filtrado o centrifugado. Además, en algunos casos la inmovilización permite aumentar la estabilidad de la enzima. Esto puede ocurrir cuando la estructura terciaria de la proteína adquiere rigidez, bien por unión covalente mediante varios enlaces con el soporte³³, bien mediante confinamiento en espacios reducidos³⁴. Esta mayor estabilidad puede llegar a permitir el empleo de la enzima en medios más severos, lo que dispararía el campo de posibles aplicaciones y facilitaría enormemente los procesos, con la consiguiente reducción de costes.

Un aspecto negativo de la inmovilización de enzimas es que no hay estrategias generalizables, pues las técnicas o los materiales de inmovilización que funcionan en un caso pueden conducir al fracaso en otro. Con todo, analizando la amplia bibliografía disponible se suelen distinguir tres métodos distintos para la inmovilización:

- a) Anclaje a un soporte: la enzima se enlaza a un soporte preexistente mediante fuerzas de tipo diverso.
- b) Encapsulación: la enzima queda atrapada en el interior de un material en formación, sin que sea necesaria unión física ni química a la pared del soporte.
- c) *Cross linking* o entrecruzamiento: las enzimas se unen unas a otras formando su propio soporte, de modo que no es necesario ningún material externo. En realidad esta técnica puede ser considerada como de insolubilización, y no de inmovilización propiamente dicha.

El presente trabajo se centra en el estudio de la inmovilización en soportes silíceos preexistentes (inmovilización post-síntesis, por anclaje o por adsorción) o en formación (inmovilización in-situ o encapsulación). La técnica de *cross-linking* queda fuera de

nuestro campo de estudio.

En cualquiera de los dos casos que vamos a abordar, tanto si la inmovilización es por adsorción superficial como por encapsulación en el interior de un material poroso, el soporte debe reunir varios requisitos. En primer lugar debe poseer elevada área superficial. Aunque esto puede lograrse empleando partículas de pequeño tamaño, resulta más ventajoso utilizar materiales de elevada porosidad, pues en el primer caso la mayor parte de la superficie expuesta se encontraría en el exterior de las partículas, lo que haría que el lixiviado en ausencia de uniones covalentes fuera máximo. El tamaño de los poros debe ser lo bastante grande como para no presentar (o minimizar) impedimentos a la difusión de sustratos y productos a través de ellos, y para ser capaces de alojar a la enzima en su interior. Además resulta evidente que el material debe ser estable.

Otro aspecto a considerar en el caso del anclaje es la forma mediante la cual se va a promover la unión de la enzima a la superficie del soporte. En principio ésta puede realizarse mediante enlaces covalentes, aunque éstos pueden causar la modificación de la estructura de la proteína, lo que puede llevar a pérdidas de actividad. La inmovilización mediante adsorción por fuerzas no covalentes (por ejemplo por atracción electrostática o interacción hidrofóbica) también se ha utilizado frecuentemente.

2.2.2.- Inmovilización de lipasas.

Las lipasas son enzimas de la familia de las esterasas (EC 3.1.1.3) con gran número de aplicaciones en campos como la industria alimentaria o la química fina. Son enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol, pero dependiendo de las condiciones también son capaces de catalizar reacciones de esterificación, tiolisis, inter y transesterificación.

Sus aplicaciones en química fina y en la industria alimentaria suelen aprovechar su regio- y enantioselectividad. En el primer caso son muy útiles para dirigir la esterificación de uno u otro ácido graso del triglicérido, por ejemplo para transformaciones en grasas destinadas a la obtención de aditivos alimentarios: lípidos estructurados, ácidos grasos omega 3 o ésteres de fitosteroles; la enantioselectividad se aprovecha en la industria farmacéutica para la obtención de compuestos quirales o

bloques quirales que luego, por vía química, se usan para obtener los compuestos quirales de interés.

Entre las aplicaciones que han surgido en los últimos años al margen de la química fina está la implantación de su uso para obtención de biodiesel (ésteres metílicos de ácidos grasos). En este caso su uso debe ser en forma inmovilizada (por el alto precio del catalizador y bajo precio del producto) y además estabilizada para poder catalizar varios ciclos de reacción en presencia de metanol.

Pese a ser solubles en medio acuoso, su uso en esta forma resulta en baja actividad y reducida estabilidad, además de presentar los inconvenientes generales, y ya comentados en la sección anterior, de la catálisis homogénea frente a la heterogénea. Para tratar de solventar estas limitaciones, se ha probado su inmovilización en una amplia variedad de soportes.

A la vista de las consideraciones hechas en la sección anterior sobre la inmovilización de enzimas, y teniendo en cuenta que su correcta aplicación requiere alcanzar un compromiso entre estabilidad, actividad, facilidad de manejo y coste, parece inevitable considerar que, una vez inmovilizada en el soporte, la enzima tendrá una actividad menor a la que presenta en su forma nativa. Aunque éste es el caso en muchas aplicaciones, existen técnicas para, aprovechando las propiedades superficiales del soporte y de la propia enzima, solventar (o minimizar) este problema. Esto es de especial aplicación en el caso de la enzima que nos ocupa.

Al contrario que muchas otras enzimas, que suelen exponer residuos superficiales hidrofílicos, la mayoría de las lipasas presenta en su superficie una región fuertemente hidrofóbica, conocida como tapadera hidrofóbica, capaz de interaccionar con residuos de su misma naturaleza³⁵. Muchos métodos de inmovilización hacen uso de esta característica, promoviendo la unión enzima-soporte mediante interacciones hidrofóbicas³⁶. Frente al uso de enlaces covalentes, esta estrategia tiene la ventaja de reducir los cambios conformacionales que sufre la enzima al unirse al soporte (distintos a los que promueven la activación interfacial), lo que suele traducirse en una menor pérdida de actividad respecto a la enzima libre³⁷. Sin embargo la naturaleza no covalente de los enlaces (relativamente débiles) puede generar problemas de lixiviado, especialmente en medios acuosos en los que la enzima es soluble. Por el contrario,

cuando el anclaje se realiza mediante interacciones demasiado débiles (por ejemplo por atracción electrostática deslocalizada entre la enzima y la pared del sólido cargados con signo contrario) apenas se retiene la lipasa cuando el soporte se suspende en un medio acuoso, y el lixiviado es aún más fuerte.

Otra ventaja del anclaje por interacción hidrofóbica es que produce la hiperactivación de la mayoría de las lipasas, un fenómeno conocido como activación interfacial. En realidad, la tapadera hidrofóbica está formada por una serie de elementos de la estructura secundaria de la proteína: cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos que cubren el sitio activo y lo hacen inaccesible a los sustratos. En presencia de interfases hidrofóbicas (que son el medio habitual en el que las lipasas suelen actuar) o de las superficies hidrofóbicas de los soportes, la tapadera se abre y el sitio activo queda libre, pudiendo llegar a aumentar la actividad de las lipasas hasta un 2000 % respecto a la forma soluble³⁸. Esto abre un interesante camino para no sólo evitar la pérdida de actividad consustancial al anclaje a superficies sólidas y al confinamiento en espacios reducidos, sino para lograr actividades aún mayores a las que presenta la enzima libre.

Desde el conocimiento de esta interesante característica, son muchos los soportes que han sido probados como agentes inmovilizadores de lipasa tratando de emular la hiperactivación de la enzima mediante interacciones hidrofóbicas^{39,40,41,42}: Accurel MP1004, EP-100 polipropileno, octil agarosa u octil sílice, lográndose así demostrar que la actividad es mayor a la que aporta la enzima inmovilizada por otras técnicas.

De entre todos los materiales empleados como soportes, los de base silícea presentan algunas ventajas incontrovertibles. En primer lugar son estables aún en condiciones muy duras y por periodos de tiempo prolongados, algo que no siempre ocurre cuando los materiales son de tipo orgánico. Además, debido a sus métodos de preparación (generalmente por condensación sol-gel de precursores silíceos) suelen presentar gran cantidad de especies hidroxilo en su superficie, lo que permite su activación posterior con gran cantidad de especies funcionales (funcionalización), entre ellas grupos orgánicos fuertemente hidrofóbicos. También ofrecen un amplio rango de porosidades disponibles, que puede ir desde los microporos hasta las grandes cavidades macroporosas, lo que permite jugar con el equilibrio entre difusión (tanto de la propia enzima en el proceso de inmovilización como de sustratos y productos a la hora de

actuar en reacciones enzimáticas) y superficie específica (en general mayor cuanto más pequeños sean los poros). Por último estos soportes pueden usarse también en medios anhidros, a diferencia de otros soportes como por ejemplo la agarosa, que tiene un alto porcentaje de agua en su estructura y cuya estructura se colapsa en medios de reacción con muy bajo contenido en agua.

El uso de esta técnica, empleando como soportes sílices amorfas funcionalizadas con grupos octilo que les confieren una fuerte naturaleza hidrofóbica, ha producido materiales con una carga enzimática de lipasa muy elevada^{43,44}. Los soportes utilizados en estos estudios son sílices mesoporosas de tamaño de poro bastante elevado (unos 30 nm), lo que hace que la enzima empleada (de unos 4-5 nm) pueda difundir sin demasiados problemas. Sin embargo, estos materiales presentan algunas limitaciones: la estructura amorfa de sus poros, el gran tamaño de estos y la tortuosidad inherente a la ausencia de patrón ordenado hacen que el proceso de lixiviado sea difícil de controlar; su superficie específica, aunque elevada (en torno a los 300 m²/g) es superada por otros materiales, y la estructura no ordenada no garantiza la conectividad.

Además, al ser el tamaño de poro varias veces superior a las dimensiones de la enzima, ésta es susceptible de formar aglomerados. Aunque esto es poco probable con materiales funcionalizados con grupos octilo, dado que la hidrofobicidad de estos grupos anclados a la pared del material excede la de los propios bolsillos hidrofóbicos a través de los cuales se agregarían las enzimas, la inmovilización en soportes de este tipo debe ser controlada para asegurarse de que tiene lugar en monocapa. A este efecto deben obtenerse las isothermas de adsorción de enzima (de Langmuir) para asegurarse de que se trabaja en la región en la que la relación carga/actividad es lineal.

En general, aunque las propiedades texturales son buenas, la dificultad de controlarlas y manipularlas a nuestro antojo limita su aplicabilidad, y hace que a la larga el soporte biocatalítico final sea mejorable.

Sin embargo, contamos con un tipo de materiales silíceos que reúnen características óptimas: tamaños de poro en el rango de las dimensiones enzimáticas comunes, estructura porosa ordenada y posibilidad de controlar de forma eficiente muchas de sus características, desde los diámetros de poro hasta sus características químicas superficiales, pasando por la tortuosidad de la red. Se trata de los MMO.

2.2.3.- Inmovilización de lipasas en MMO.

En todos esos aspectos, los MMO suponen una mejora sobre las sílices amorfas preparadas por métodos sol-gel. Sus propiedades texturales son óptimas y además, como se explicó en el apartado 1.1.4, la funcionalización de las paredes internas se puede realizar de forma sencilla con una amplia variedad de grupos funcionales (incluyendo cadenas hidrofóbicas de tamaño variables) bien por co-condensación, bien por funcionalización post-síntesis. Desde su descubrimiento, los MMO se han postulado como excelentes soportes de inmovilización de biomoléculas, y desde los pioneros trabajos de Balkus y Díaz en 1996⁴⁵ se han probado con una gran variedad de enzimas^{46,47}. Una reciente revisión pone de manifiesto las ventajas de la inmovilización en este tipo de soportes⁴⁸.

En casi todos los casos, la encapsulación de enzimas en este tipo de materiales se ha realizado por anclaje o inmovilización post-síntesis, es decir, mediante la unión por algún tipo de fuerza de la enzima a la pared interna o externa del material silíceo. Es la estrategia más sencilla y la que seguiremos en la primera parte de nuestro estudio. Sin embargo, también ha habido algunos intentos de encapsulación de enzimas en MMO, es decir de atrapamiento de la enzima en el interior de la red porosa ordenada en el propio proceso de síntesis. Es lo que llamamos inmovilización in-situ, y será el objetivo de la segunda parte de esta tesis doctoral.

2.2.3.1.- *Inmovilización por anclaje*

En el caso concreto de las lipasas, aunque se han logrado algunos resultados prometedores mediante esta vía aún queda mucho camino por recorrer. El tamaño habitual de este tipo de enzimas (en torno a 4-5 nm en su dimensión más grande) les permite entrar en los canales de los MMO más comunes, aunque la difusión en un medio de espacio tan restringido es problemática y puede reducir la eficiencia del proceso⁴⁹. Esta restricción hace especialmente difícil la aplicación de las uniones covalentes, pues el anclaje irreversible de una enzima en canales poco mayores que su propio diámetro bloquearía los poros, volviendo la mayor parte de la superficie interna del material inaccesible. De hecho, en el único ejemplo de inmovilización covalente de lipasas en MMO (realizada mediante la activación de SBA-15 con glutaraldehído), aunque no se ofrecen datos sobre la cantidad de enzima retenida, sí que se documenta

una baja actividad hacia sustratos voluminosos (trioleína) en comparación con el derivado preparado mediante adsorción, lo que indica un bloqueo de los poros en el primer caso⁵⁰. Como señaló P. A. Wright en una revisión sobre el tema, se necesitan poros al menos tres veces mayores que el diámetro de la enzima para poder aplicar este tipo de anclaje⁴⁶. Es decir, suponiendo un tamaño de la enzima de unos 4-5 nm, se requerirían canales de 12 a 15 nm para afrontar la unión por enlaces covalentes con garantías. Actualmente estos tamaños, aunque alcanzables, siguen siendo inhabituales, especialmente en materiales con poros cilíndricos.

El anclaje de lipasas por fuerzas más débiles, como atracción electrostática o enlaces de hidrógeno, se ha probado con buenos resultados de carga enzimática, mostrando el esperado efecto estabilizador frente a la temperatura consustancial al confinamiento en espacios reducidos⁵¹. Sin embargo, el lixiviado y la consiguiente pérdida de actividad en sucesivos ciclos de reacción parecen difíciles de evitar⁵². Algunas estrategias como bloquear la entrada de los poros mediante sililación muestran cierto éxito en evitar la salida de la enzima, pero también reducen drásticamente su actividad, debido a la dureza de las condiciones del proceso de sililación^{53,54}. En todos los casos, el mecanismo de atracción postulado es una combinación de interacciones de van der Waals y atracciones electrostáticas. Esto provoca que, generalmente, la eficiencia del proceso disminuya al aumentar el pH⁵⁰, debido a que la sílice, por encima de pH 2, presenta una carga global negativa, mientras que el punto isoeléctrico de las lipasas suele ser bastante mayor (habitualmente se encuentra en torno a 6-8).

Como era de esperar, los mejores resultados hasta la fecha se han logrado mediante el empleo de fuerzas hidrofóbicas. La funcionalización con grupos octilos de muestras de FDU-12, sumada a la aplicación de altas presiones, lleva a cargas enzimáticas elevadas y muy buenos resultados de actividad catalítica⁵⁵. La sostenibilidad de esta actividad a lo largo de sucesivos ciclos de reacción indica ausencia de lixiviado, debido al confinamiento de las biomoléculas en el interior de las cajas. Sin embargo, el proceso es en sí demasiado complejo (implica la compactación del MMO en forma de columna cromatográfica) y parece difícilmente generalizable, además de que sólo resulta eficiente en materiales con poros del tipo caja.

El anclaje con grupos butilo, sin embargo, resultó menos efectivo y conduce a cargas aún menores que su análogo silíceo. Probablemente esto se deba al hecho de haberse realizado en muestras de MCM-41 con tamaño de poro bastante pequeño (menor de 4 nm) con lo que la reducción adicional por la presencia de la cadena hidrocarbonada resulta más importante que la hidrofobización del material⁵⁶.

2.2.3.2.- Encapsulación o inmovilización in-situ.

Una de las estrategias que se han empleado con más éxito para la encapsulación de lipasas es el atrapamiento o encapsulación sol-gel, basado en la condensación de precursores de sílice alrededor de la enzima. De este modo se forma una estructura sílicea porosa en cuyo interior la enzima queda atrapada^{57,58}. Sin embargo, la falta de control en el proceso conduce a materiales de estructura amorfa, lo que hace que se arrastren las limitaciones citadas en el apartado anterior. La conjunción de esta técnica con la adición de surfactantes al medio puede conducir al atrapamiento de la enzima en el interior de una red mesoporosa ordenada con todas las ventajas ya señaladas de los MMO.

Sin embargo, esta estrategia choca muy pronto con un obstáculo aparentemente insalvable: las condiciones de síntesis de los MMO son habitualmente severas, e incompatibles con la integridad de la estructura terciaria de la enzima, lo que conduciría inevitablemente a la pérdida de su actividad. De los dos grupos de surfactantes más empleados, los de tipo catiónico (tipo alquiltriethylamonio, que conducen a la familia de materiales M41S) conducen a materiales con poros demasiado estrechos. Esto podría llevar a que la enzima distorsionara la red porosa durante su formación y condujera a materiales amorfos o escasamente ordenados. Además, se ha documentado como este tipo de compuestos inhiben la actividad lipolítica de la lipasa⁵⁹, que es la enzima sobre la que se basa la mayor parte de nuestro trabajo. Por otra parte cuando se usan los de tipo no iónico (tipo pluronic, que conducen a materiales como SBA-16, FDU-12 o KIT-6) las condiciones de síntesis son muy severas, especialmente el pH, que oscila entre valores cercanos a 1 y negativos. Esto hace que el gel de síntesis sea incompatible con la actividad de la mayoría de las enzimas. El uso de enzimas extremófilas, capaces de subsistir en esas condiciones, conduciría a materiales comercialmente inaplicables dado su elevado precio.

Es por este motivo que, pese a las ventajas de esta ruta sobre la inmovilización post-síntesis o anclaje (especialmente el ahorro económico inherente a la eliminación de una etapa en el proceso) son pocos los trabajos que han apostado por esta vía. Pese a ellos, hay algunos intentos y los resultados son en algunos casos prometedores. Todos ellos usan distintas aproximaciones para sortear el problema principal: lograr un material estructurado preservando la actividad enzimática en el mayor grado posible.

Por ejemplo, Mureseanu y colaboradores optaron por emplear mezclas de varios surfactantes, tratando de suavizar las condiciones del gel inicial⁵⁹. Otros intentos del mismo estilo han empleado surfactantes basados en polietileno⁶⁰. Sin embargo, estos estudios condujeron a materiales pobremente ordenados, con una estructura de poros amorfa que, en el mejor de los casos, ofrece algunos dominios estructurados a corto alcance. Son lo que en la bibliografía suelen llamarse *mesocelular foams* (MCF). Aunque estos materiales presentan algunas ventajas sobre los materiales porosos desordenados (como la distribución más estrecha de tamaños de poro o una mejor conectividad), no pueden ser calificados como MMO con propiedad.

Más éxito tuvieron Blin y colaboradores que, mediante el uso de surfactantes fluorados, lograron obtener materiales silíceos mesoporosos de estructura hexagonal con alto contenido en glucosidasa y en un solo paso⁶¹. Sin embargo la enzima perdió gran parte de su actividad durante el proceso. El intento más exitoso hasta la fecha, de aparición muy reciente, ha consistido en la encapsulación de lipasa en una matriz hexagonal usando surfactantes de tipo catiónico a pH neutro y temperatura ambiente⁶².

Sin embargo llama la atención la ausencia en la bibliografía de auténticos intentos de lograr la encapsulación in-situ de enzimas empleando surfactantes no iónicos, el tipo más empleado y más estudiado en los últimos años. Además, como ya hemos comentado los materiales resultantes suelen tener mejor estabilidad térmica y tamaños de poro algo mayores, lo que resulta crucial a la hora de alojar en su interior enzimas de varios nanómetros de diámetro medio. Tal es el objetivo de la segunda parte de esta tesis.

2.2.4.- Lipasa de *Candida antarctica* B

La lipasa que usaremos es la procedente de *Candida antarctica* B (CaLB), suministrada por la empresa Novo Nordisk en forma soluble de extracto crudo con una concentración de lipasa de 8 mg/g. Se trata de una variedad que no sufre el fenómeno de activación interfacial⁶³, aunque como todas las lipasas posee el dominio hidrofóbico en su superficie y su inmovilización por este tipo de interacciones está bien documentada^{43,44}. Su peso molecular es de unos 32 KDa, sus dimensiones de aproximadamente 3 x 4 x 5 nm y su punto isoeléctrico de 6⁶⁴.

2.2.5.- Peroxidasa de rábano (HRP): empleo en biosensores

Además de la lipasa, en este estudio se ha probado con carácter preliminar la encapsulación de otras tres enzimas en MMO: glucosa oxidasa (GOX), lacasa o polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa de rábano (HRP). El objetivo principal es comprobar la universalidad de los procedimientos aplicados. Además, al catalizar las tres enzimas distintas reacciones de oxidación, los materiales resultantes podrán ser aplicados en un campo en el que se están haciendo grandes progresos en los últimos años, y que constituye un nuevo nicho para los materiales con enzimas inmovilizadas: los biosensores.

Un sensor químico es un dispositivo capaz de traducir la información química de una muestra en una señal analítica. Consta básicamente de dos componentes: a) el *receptor*, que se encarga de reconocer selectivamente la información química de la muestra y transformarla en un señal reconocible por el segundo elemento: b) el *transductor*, sobre el que está colocado el receptor, y que se encarga de transformar la señal química en otro tipo de señal fácilmente procesable.

De acuerdo a la naturaleza del receptor, tenemos distintos tipos de sensores. Los que a nosotros nos ocupan son los biosensores, en los que el receptor tiene una procedencia biológica (en nuestro caso enzimas, pero también puede tratarse de ADN, células, etc.).

La mayor parte del trabajo, y el que ha dado resultados más notables, se ha dedicado a los materiales con HRP inmovilizada. Estos compuestos son susceptibles de aplicación en la determinación de fenoles y sus compuestos derivados, un objetivo de

gran importancia desde el punto de vista medioambiental. Se trata de especies tóxicas que se manifiestan en numerosos procesos industriales, estando presentes en las aguas residuales procedentes de la industria del aceite, pinturas, polímeros e incluso en la industria farmacéutica. Por otra parte, la calidad de ciertos productos alimenticios como los zumos y refrescos embotellados se expresa, entre otros parámetros, en relación a la presencia de fenoles. Así pues, la detección de estas sustancias ha de ser selectiva y sensible.

Dentro de los métodos de detección, en los últimos años se han empleado biosensores modificados con tirosinasa, lacasa o peroxidasa de rábano. En general, los basados en peroxidasas han resultado ser los más sensibles a la mayoría de los derivados fenólicos, que actúan como dadores de electrones frente a la peroxidasa. En este caso la señal analítica es la regeneración electroquímica del fenol oxidado por la enzima en presencia de agua oxigenada. El mecanismo es el siguiente.

En primer lugar, la HRP cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) empleando como mediadores numerosas sustancias, entre las que se encuentran los compuestos fenólicos. En un primer paso, la enzima cataliza la reducción del H_2O_2 , perdiendo dos electrones y pasando así de la forma nativa a una forma oxidada que se denomina “Compuesto - I”. La regeneración de la forma nativa se lleva a cabo mediante dos etapas de reducción en cada una de las cuales interviene un electrón, pasando por una forma intermedia denominada “Compuesto - II” y de ahí a la forma nativa. Es en estas etapas cuando entra en juego el fenol, que se oxida. Esta última reacción convierte el fenol a quinona y/o radicales libres, que son a su vez electroactivos y se reducen en la superficie del electrodo. La reducción es proporcional a la concentración de fenoles en la disolución.

En realidad, las peroxidasas son capaces de dirigir la transferencia de electrones entre las moléculas de enzima y el electrodo sin necesidad de mediadores. Sin embargo la regeneración de la enzima a su forma nativa es lenta y suele verse mejorada al emplear los mediadores. Así, estas sustancias son detectadas por el electrodo permitiendo cuantificar su presencia. En cualquier caso la sensibilidad viene marcada por la corriente de fondo debida a la transferencia directa de electrones procedentes de la enzima. El proceso de inmovilización de la peroxidasa tiene la ventaja de bloquear la

transferencia de electrones entre la enzima y los mediadores, aumentando la sensibilidad del biosensor hacia los fenoles.

La figura 3 Muestra un esquema general del proceso:

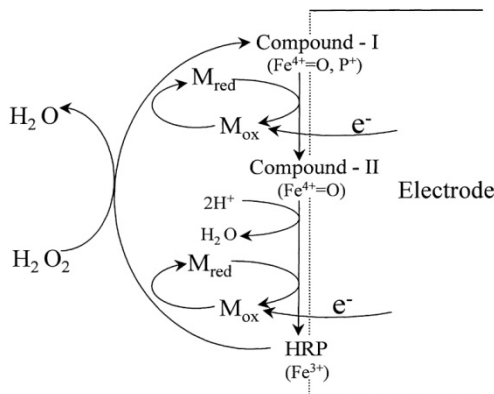


Figura 3: esquema de la reducción de H_2O_2 catalizada por HRP en presencia de un mediador.

2.2.5.1.- Inmovilización de HRP en MMO

El empleo de sílices mesoporosas ordenadas como soportes de peroxidasas ya ha sido descrito anteriormente en la bibliografía. De hecho, ya en el informe original de Díaz y Balkus, que constituye el primer intento de inmovilización de enzimas en MMO, los autores intentaron inmovilizar HRP en MCM-41⁴⁵. Como el tamaño de la enzima era mayor al diámetro de los poros la inmovilización fue un fracaso, mientras que otras enzimas de menor tamaño como el citocromo c sí que pudieron ser introducidas con éxito en la red porosa.

El grupo de Inagaki también ha tratado de inmovilizar HRP en MCM-41 y FSM-16, postulando que, a consecuencia del confinamiento en espacios reducidos, su estabilidad una vez alojada en los MMO es óptima cuando el tamaño es lo más cercano posible al del poro en el que está alojada⁶⁵. Los resultados muestran una mayor actividad de la enzima inmovilizada con respecto a su forma nativa cuando actúa en disolventes orgánicos^{65,66}.

3.- OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar la inmovilización de enzimas en diferentes Materiales mesoporosos ordenados mediante distintas técnicas y evaluar las ventajas que ofrecen este tipo de materiales como soportes enzimáticos. Para ello en un primer paso sintetizaremos los MMO, aplicando técnicas que permiten controlar sus propiedades texturales (tipo de estructura interna, tipo y tamaño de los poros) y químicas (síntesis de materiales puramente silíceos o funcionalizados mediante distintas técnicas). Ello nos permitirá evaluar el efecto de estas variables sobre los catalizadores obtenidos a partir de los distintos materiales sintetizados.

Además se intentará lograr la inmovilización de las enzimas en el interior de las redes porosas en un solo paso (inmovilización *in-situ*).

Estas técnicas se intentarán aplicar principalmente a la lipasa, aunque en algunos casos se intentará su extensión a otros tipos de enzimas como HRP, GOX o PPO.

4.- EXPERIMENTAL

4.1.- SÍNTESIS DE LOS MMO PARA INMOVILIZACIÓN POST-SÍNTESIS

En este apartado se incluyen todos los MMO que se han sintetizado para ser posteriormente sometidos, previa calcinación o extracción de surfactante, a la inmovilización de enzimas *post-síntesis*.

Los materiales incluidos en esta sección son de tres tipos:

- a) Materiales mesoporosos ordenados silíceos.
- b) Materiales mesoporosos ordenados silíceos funcionalizados con grupos metilo.
- c) Organosílices periódicos mesoporosos.

4.1.1.- Materiales mesoporosos ordenados silíceos

La síntesis de estos materiales se realizó mediante procesos convencionales, sin introducir variaciones sobre resultados ya publicados. Además se ha hecho un especial esfuerzo en aplicar técnicas para obtener los mayores tamaños de poro posibles, pues se necesitan diámetros grandes para alojar la enzima en su interior. Se han abarcado dos tipos de sistemas porosos. Una cuidadosa selección de los distintos materiales presentes en la bibliografía, basada en las premisas establecidas en la introducción, ha permitido seleccionar los de mayor calidad en cada caso, con pocos defectos estructurales, reproducibles y sencillos de sintetizar:

- a) De poros cilíndricos: $p6mm$ (MCM-41 y SBA-15) e $1a\bar{3}d$ (KIT-6).
- b) De poros del tipo caja: $Im\bar{3}m$ (SBA-16) y $Fm\bar{3}m$ (FDU-12).

De esos materiales, solo uno, el MCM-41, se prepara en medio básico y utiliza surfactantes del tipo catiónico como agente director de estructura. Todos los demás utilizan surfactantes del grupo de los copolímeros de tres bloques (Pluronic) y requieren un medio fuertemente ácido.

De forma general y salvando particularidades, todas las síntesis se han realizado por el mismo procedimiento. La primera etapa tiene lugar en un bote de polipropileno convenientemente cerrado para evitar fugas. Primero se disuelve/n el/los surfactante/s en el medio acuoso previamente acidificado con la cantidad adecuada de HCl. A

continuación se añaden los correspondientes aditivos cuando sean necesarios. Por último se añade la fuente de silicio, que fue tetraetil ortosilicato (TEOS) en todos los casos, gota a gota y bajo agitación suave. Este gel de síntesis se pone en un baño a la temperatura adecuada (35-45°C según el caso) y se continúa agitando. En estas condiciones, se produce la precipitación de un sólido blanco en un periodo que va de 5 minutos a una hora. Pasadas entre 2 y 24 horas según la muestra, se trasvasa la mezcla a autoclaves de teflón con cubierta de acero inoxidable especialmente sellados para evitar fugas y mantener la presión autógena. Estos autoclaves se llevan a una estufa a 100°C sin agitación, donde tiene lugar la segunda fase: el tratamiento hidrotermal, con una duración de entre 1 y 7 días. Pasado este tiempo el gel se filtra y se lava con agua destilada para obtener un sólido pulverulento que, una vez seco, se pesa y recoge en un vial.

Con el fin de ser utilizados en la inmovilización de lipasa, el surfactante presente en los canales de los MMO debe ser eliminado. En el caso de los materiales silíceos esto se realizó mediante un proceso calcinación. En una primera etapa, se calienta la muestra de forma constante hasta 550°C durante un tiempo de 3 horas y bajo un flujo de N₂, de entre 100 y 120 cm³/min, y se mantiene así una hora más. Esto provoca la descomposición térmica del surfactante orgánico, facilitando su posterior calcinación y haciendo ésta menos exotérmica. Por último se hace pasar un flujo de aire sintético durante seis horas a esa misma temperatura.

A continuación se detallan las condiciones concretas utilizadas para cada muestra.

4.1.1.1.- Sistemas de poro cilíndrico: MCM-41, SBA-15 y KIT-6.

Dentro de este grupo se han preparado muestras de dos clases. En primer lugar, dos muestras con simetría plana hexagonal *p6mm*: MCM-41 y SBA-15. La primera de ellas emplea surfactantes catiónicos del grupo de las sales de amonio cuaternarias y se prepara en medio básico. Este material fue tomado de un estudio anterior, por lo que el procedimiento de síntesis y los detalles de su caracterización no se muestran aquí, pudiendo consultarse en la referencia ⁶⁷. El material SBA-15 se ha realizado siguiendo el informe original publicado en 1998¹². La composición molar del gel de síntesis es 1 TEOS : 0,017 P123 : 200 H₂O : 2,9 HCl. La primera fase de síntesis dura 24 horas y se realiza a 40°C. La precipitación se produce en unos 20 minutos. El posterior tratamiento

hidrotermal se hace a 100°C durante 48 horas.

Por otro lado, la muestra KIT-6, de simetría cúbica $Ia\bar{3}d$ se ha sintetizado siguiendo el procedimiento descrito por Kim y col. en 2005¹⁷. Se sintetiza con el pluronic P123 como director de estructura, y tiene como particularidad la adición de butanol y el empleo de bajas concentraciones de ácido. El butanol se añade a la mezcla tras disolver el pluronic. Dentro de todas las composiciones posibles, nos hemos situado en el extremo que genera muestras del mayor tamaño de poro, resultando una composición molar del gel: 1,2 TEOS : 0,017 P123 : 195 H₂O : 1,83 HCl : 1,31 Butanol. La primera fase se desarrolla a 35°C durante 24 horas. La precipitación se produce tras una hora. El tratamiento hidrotermal se realiza durante otras 24 horas a una temperatura de 100°C.

4.1.1.2.- Sistemas con poros del tipo caja: SBA-16 y FDU-12.

Se han sintetizado dos tipos de muestras con esta clase de poros. Para los materiales del tipo SBA-16, de simetría $Im\bar{3}m$ y formados por cajas en disposición cúbica centrada en el cuerpo, se ha usado la referencia 16. Como se explicó en la introducción, mediante la mezcla de dos surfactantes en combinación con la variación en la duración y temperatura del tratamiento hidrotermal, Kim y col. consiguen expandir y modular tanto los tamaños de las cajas como los de las ventanas. La composición de gel que hemos escogido es 1 TEOS : 0,0037 F127 : 0,0016 P123 : 144 H₂O : 4,4 HCl. Es decir, usamos una proporción alta de P123 en la mezcla, lo que debería conducir a cajas de gran tamaño. La precipitación del sólido se produce a los 30 minutos. Tras 24 horas a 35°C, se pasa a la fase de tratamiento hidrotermal, que se extiende durante 7 días a 100°C. La prolongación del tiempo en esta fase debe producir una expansión en el diámetro de las aperturas entre cajas.

Para las muestras de simetría $Fm\bar{3}m$ FDU-12, con las cajas en disposición cúbica centrada en las caras, se ha empleado la referencia 15. La composición de gel es 1 TEOS : 0,004 F127 : 158 H₂O : 6,02 HCl : 1,68 KCl : 0,42 TMB (trimetil benceno). El TMB se añadió a la mezcla después de disolver el pluronic en medio ácido. Tras añadir el TEOS se mantuvo 24 horas a 45°C, observándose el precipitado blanco en apenas cinco minutos. El tratamiento hidrotermal duró 72 horas y se realizó a 100°C.

4.1.2.- Síntesis de materiales mesoporosos ordenados silíceos metilados por co-condensación

Mediante el procedimiento de co-condensación, se prepararon análogos metilados de todos los materiales especificados en el apartado anterior excepto del MCM-41. Por lo demás la síntesis es idéntica a la descrita para las muestras silíceas, con tan sólo dos salvedades.

En primer lugar, la fuente de silicio fue una mezcla de alcóxidos de silicio compuesta por TEOS y su análogo metilado, metiltrietoxisilano (MTEOS). La composición molar de esta mezcla fue de 95% TEOS-5% MTEOS, excepto para la muestra tipo FDU-12, en la que fue de 90% TEOS-10% MTEOS. Antes de añadirlos a la disolución acuosa de surfactante con los aditivos correspondientes, los dos alcóxidos se mezclaron durante unos 10 minutos bajo agitación suave para dar lugar a una mezcla homogénea.

En segundo lugar la eliminación del surfactante no pudo realizarse por calcinación, pues esto destruiría los grupos metilo anclados en la pared del material, impidiendo así obtener un material funcionalizado. La alternativa adoptada consiste en eliminar el surfactante mediante extracción en medio ácido. Para ello, se pusieron en contacto 1,5 g de sólido con 20 mL de HCl (35%) y 205 mL de etanol, a 70°C y bajo agitación, durante periodos de 24 horas⁶⁸. Se precisaron al menos dos lavados consecutivos para lograr la eliminación cuantitativa de surfactante, que se monitorizó mediante análisis termogravimétrico (ATG).

4.1.3.- Síntesis de organosílices periódicos mesoporosos

Para la síntesis de este tipo de materiales se siguió la ruta descrita en la referencia número 29, pero sustituyendo el precursor organosilíceo empleado en ese artículo (BTME) por BTEE (1,2-bis(trietoxisilil)etano). Esta síntesis debe conducir a materiales con simetría hexagonal plana $p6mm$ (tipo SBA-15).

Por lo demás, el procedimiento de síntesis es muy similar al desarrollado para las muestras anteriores, tanto las puramente silíceas como las funcionalizadas. En una síntesis típica, 1,76 g de P123 fueron disueltos a temperatura ambiente en 69 g de agua a la que previamente se habían añadido 5,18 g de KCl y 1,18 g de HCl. Después de diez

minutos de agitación vigorosa, se añadieron a la mezcla 3,08 g de BTEE. La disolución se mantuvo 24 horas a temperatura ambiente para ser posteriormente transferida a un autoclave y mantenida en su interior durante 24 horas a 100°C en una estufa. El sólido resultante se filtra, se seca a temperatura ambiente y se recoge en un vial. La extracción del surfactante debe realizarse, al igual que en el caso de las muestras funcionalizadas, mediante extracción ácida en una mezcla de etanol y HCl, en idénticas condiciones a las especificadas en el apartado anterior.

4.2.- SÍNTESIS DE MMO PARA INMOVILIZACIÓN IN-SITU

En el caso de estos materiales, se trata de sintetizar el MMO en presencia de enzima, de modo que ésta quede atrapada en el interior de la red porosa mientras el material se forma. Esto hace que el procedimiento de síntesis sea considerablemente más complejo, en parte porque la actividad de la enzima y su incorporación al material deben ser monitorizados durante todo el proceso.

La mayoría de las muestras sintetizadas mediante este procedimiento han tenido como objeto encapsular lipasa, que es la enzima con la que se ha abierto esta nueva línea de investigación. Sin embargo, con posterioridad y con carácter preliminar, se han aplicado las mismas condiciones a otras tres enzimas: glucosa oxidasa (GOX), polifenol oxidasa o lacasa (PPO) y peroxidasa de rábano (HRP).

4.2.1.- Inmovilización in-situ de lipasa

El procedimiento general de síntesis es el siguiente. Primero la cantidad adecuada de surfactante (P123 o F127 según el caso) es disuelta en agua a temperatura ambiente en un bote de polipropileno. El KCl se añade a continuación en las síntesis que lo requieren. A continuación se añade la enzima en forma de extracto, hasta alcanzar una concentración enzimática de 2,3 mg/mL. Después de 30 minutos de agitación suave se añade HCl 3 M hasta alcanzar un pH de 3,5. Por último se añade la fuente de silicio, que es TMOS en todos los casos, se cierra el bote de polipropileno y se mantiene en agitación suave a 27°C durante un tiempo de hasta 10 días.

Durante todo el tiempo de síntesis, y a intervalos regulares, se monitorizó la actividad enzimática hacia al hidrólisis de acetato de p-nitrofenilo (p-NPA) tanto de la

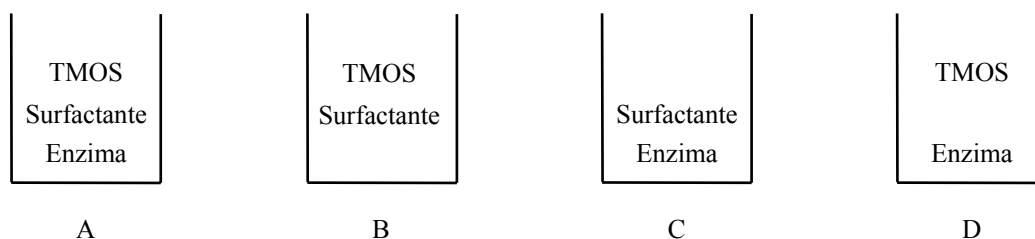
suspensión como del sobrenadante. Asimismo se midió la cantidad de enzima total presente en el sobrenadante mediante el método Bradford⁶⁹. La síntesis se dio por finalizada en el momento en que ambos factores permanecieron estables.

De forma simultánea a esta síntesis principal (que llamaremos A) y con el objeto de controlar todas las variables el proceso, se prepararon otras tres muestras con un gel de composición idéntica pero en los que se eliminó alguno de los ingredientes:

B: sin enzima. Su objetivo es comprobar el efecto de la enzima en el material mesoporoso final.

C: sin TMOS. Su objetivo es monitorizar la actividad de la lipasa en el medio de síntesis a pH 3,5 y con el resto de componentes presentes (surfactante, HCl, agua y KCl en algunos casos). Los resultados muestran que la lipasa CaLB es estable, pues la pérdida de actividad en esas condiciones durante los 10 días que se extendió la síntesis fue despreciable.

D: Sin surfactante. Su objetivo es monitorizar el proceso de síntesis y encapsulación sol-gel cuando no está dirigido por la presencia de tensioactivos. Los resultados muestran que en estas condiciones el sólido no precipita, lo que indica que el surfactante es necesario para que se forme una estructura sólida, dato que está en consonancia con la teoría del coensamblaje cooperativo comentada en la introducción.



Una composición molar típica del gel síntesis es: 1,00 TMOS : 0,0031 surfactante : 0,00455 HCl : 214,89 H₂O. El surfactante es P123 en unos casos (lo que conducirá a muestras con estructura de poros cilíndricos tipo SBA-15) y en otros F127 (lo que conducirá a sistemas con poros del tipo caja y ventana tipo SBA-16 o FDU-12). En el primer caso las muestras serán denotadas como E-P123, y en el segundo como E-F127. En ambos casos se prepararon muestras en varias concentraciones de KCl, lo que se denota con los sufijos S1, S2 y S3, que se refieren a concentraciones de 0,5, 1 y 1,5 M respectivamente.

Para extraer el surfactante del interior de estos materiales, las condiciones habituales de la extracción en medio ácido (aplicadas a los MMO funcionalizados y a los OPM) fueron modificadas, con el objetivo de evitar la desnaturalización de la enzima. Es por ello que se usa una solución acuosa ácida HCl/H₂O de pH 3,5 (el empleado en la síntesis de los materiales, y al que lipasa ha demostrado ser resistente). El proceso tiene lugar a temperatura ambiente. La relación sólido/líquido empleada es la misma que la empleada anteriormente (1 g de sólido por cada 150 mL de disolución).

El contacto se mantiene durante 24 horas, renovándose la disolución a las 6 horas. En cada cambio de disolvente se mide la actividad del sólido y el contenido en proteína de la disolución mediante el método Bradford, para evaluar la pérdida de actividad o el lixiviado de la enzima durante el proceso. Finalmente el material es filtrado, lavado con agua y acetona y secado a temperatura ambiente.

Paralelamente, y con el único objetivo de realizar las isotermas de adsorción de N₂, una parte de la muestra fue calcinada por el procedimiento habitual.

4.2.2.- Inmovilización in-situ de PPO y HRP

Las síntesis realizadas con estas dos enzimas se han realizado en las mismas condiciones que las llevadas a cabo con lipasa, ya especificadas en el apartado anterior. En este caso el surfactante empleado ha sido siempre F127, pues en las síntesis con lipasa se comprobó que es el que lleva a materiales con poros del tipo caja y ventana. La cantidad de KCl añadido fue de 0,5 M. En ambos casos las síntesis se realizaron con la enzima procedente del extracto crudo y en forma purificada.

4.3.- TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

En este apartado se detallan las técnicas empleadas para la caracterización de todos los tipos de materiales.

4.3.1.- Difracción de Rayos X (DRX)

Supongamos que un haz de luz monocromática de longitud de onda λ incide con ángulo de incidencia θ sobre un cristal de espacio interplanar d . De acuerdo con la Ley de Bragg, la condición necesaria para que se dé una interferencia constructiva es que se

cumpla:

$$2 \cdot d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda$$

Barriendo la muestra con un haz de radiación de rayos X de longitud de onda determinada y con ángulo de incidencia variable, se obtienen máximos de intensidad en los ángulos que verifican esa condición. De esta manera, esta técnica se utiliza para comprobar la periodicidad de los sólidos mesoporosos, permitiendo comprobar hasta qué punto el material está ordenado a largo alcance y obtener una distancia interplanar aproximada.

Además, es posible utilizar las ecuaciones que relacionan el espacio interplanar con el tamaño de celda para cada uno de los grupos de simetría involucrados para asignar índices y así obtener los grupos de simetría planos o espaciales que corresponden a cada una de las mesofases. Empleando las mismas ecuaciones se obtiene también el tamaño de celda correspondiente.

En nuestro caso, los patrones de difracción de rayos X (DRX) se registraron en un difractómetro Siefert XRD 3000P operando a bajo ángulo (0.5-7°) y utilizando radiación CuK_α de 1,542 Å. Se utilizó una velocidad de paso de 0,02°/min y un tiempo de acumulación de 3 segundos por paso.

4.3.2.- Isotermas de adsorción de N_2

Esta técnica se basa en la adsorción/desorción de un gas inerte (en nuestro caso N_2) en el interior de la muestra, a temperatura constante y presión variable. En una primera fase, y tras la evacuación del material (con el objetivo de vaciar sus poros) el N_2 es adsorbido, obteniéndose una medida del volumen adsorbido ($\text{cm}^3 \text{ N}_2/\text{g}$ de muestra) frente a la presión relativa. De esta forma, se obtiene de forma directa el volumen de poro.

En la segunda fase se desorbe el N_2 mediante una reducción de la presión, obteniéndose la lectura del volumen que permanece en el interior frente a la presión relativa.

En nuestro caso las isotermas de adsorción de N_2 de los materiales, una vez extraído el surfactante mediante calcinación o extracción ácida, se obtuvieron en un

Micromeritics TriStar3000 operando a 77 K. Las muestras silíceas y las procedentes de la inmovilización *in-situ* se evacuaron a 350°C durante 30 horas antes del análisis. En cambio los MMO metilados y las OPM se evacuaron a 90°C, para no destruir la parte orgánica y tener una medida fiable de sus auténticas dimensiones.

La forma de la isoterma, conforme a la clasificación establecida por la IUPAC (presencia o no de ciclos de histéresis, forma de los mismos etc.) permite deducir de forma sencilla el tipo de porosidad del material. La aplicación del método BET (Brunauer-Emmet-Teller) permite obtener el valor del área superficial. Finalmente, la aplicación del método BJH (Barrett-Joyner-Halenda) a la rama de adsorción de la isoterma permite calcular la distribución de tamaño de poro y el diámetro medio. En algunos casos, y sólo con carácter orientativo, se ha aplicado el mismo método a la rama de adsorción para obtener una estimación del tamaño de la ventana en las muestras con poros de tipo caja-ventana, aunque esta metodología está siendo desestimada en los últimos años.

4.3.3.- Análisis Termogravimétrico (ATG)

Esta técnica se encarga de medir la pérdida de masa que sufre un material sólido al aumentar la temperatura de forma controlada. Para ello se coloca una pequeña cantidad de muestra en una microbalanza y, partiendo de la temperatura ambiente, se la somete a un gradiente de temperatura constante hasta alcanzar valores cercanos a los 900°C.

El resultado es una curva (llamada termograma) donde se representa el porcentaje de la masa original que permanece estable frente a la temperatura. Esta curva permite hacerse una idea de la estabilidad térmica del material. Además, la derivada de esta curva permite localizar los picos de temperatura a los que se produce una pérdida masiva de material. Generalmente estos picos pueden asociarse con los distintos grupos orgánicos presentes en la muestra, o bien al agua que se produce como resultado de la condensación de los grupos silanol.

Los análisis termogravimétricos se desarrollaron en un equipo Perkin-Elmer TGA7, barriendo un rango de temperaturas de 20-900°C a una velocidad constante de 20°C/min bajo una corriente de aire sintético.

4.3.4.- Resonancia Magnética Nuclear de Si²⁹ (RMN)

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Si²⁹ se obtuvieron en un instrumento Bruker Avance 400WB, empleando una sonda de alta velocidad BL7 y rotores de óxido de zirconio de 7 mm de diámetro, aplicando pulsos de $\pi/3$ de 4 μ s a intervalos de 240 segundos. Las muestras fueron giradas al ángulo mágico a 5 kHz. La cuantificación se ha hecho por deconvolución de los espectros ajustando a curvas gaussianas.

4.3.5.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron en un microscopio JEOL JEM 2000 FX operando a 200 Kv y en un Philips Tecnai G2 operando a 200Kv.

En todos los casos se hicieron series de giro para verificar la estructura de las muestras. La preparación de muestras se hizo dispersando una pequeña cantidad del sólido en acetona y dejando caer algunas gotas sobre una rejilla de cobre cubierta con una capa de carbón agujereado.

4.3.6.- Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

Las micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) se hicieron con un microscopio JEOL JSM 6400 Philips XL30 operado a 20 Kv y un SEM de alta resolución FEG Hitachi S-5500 operando a 1-5 kV. En todos los casos, la preparación de los materiales se hizo triturándolos con un mortero, dispersándolos en etanol y dejando caer algunas gotas sobre una microrejilla de cobre recubierta con una capa de carbón agujereado.

4.4.- PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LIPASA.

En las muestras en las que la inmovilización de la lipasa se realizó post-síntesis o por anclaje, es necesario propiciar contacto entre la enzima y el material mesoporoso. La inmovilización se desarrolló en las mismas condiciones tanto en las muestras silíceas como en las metiladas o en las OPM. En el primer caso las muestras fueron previamente calcinadas, y en los otros dos fueron extraídas en medio ácido, mediante el proceso

indicado en los apartados correspondientes. El procedimiento general fue el siguiente.

Diferentes cantidades del extracto comercial de CaLB suministrado por Novozyme (entre 0,25 y 2,5 mL) fueron disueltas en tampón fosfato 50 mM a pH 5, hasta alcanzar un volumen total de 20 mL. Este extracto tiene una concentración de enzima de 8 mg/mL, determinado por el método de Bradford. Esta concentración corresponde a una banda mayoritaria vista por electroforesis, por lo que se puede considerar que es la única proteína del extracto.

A esta disolución se le añadieron 100 mg del sólido en cuestión que se mantuvieron en suspensión con un agitador helicoidal. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, a partir de las cuales se determinó la actividad de suspensión y sobrenadante. Este último se obtuvo sometiendo las alícuotas de suspensión a centrifugación a 13000 rpm durante dos minutos. De este modo se pudo monitorizar el contenido en enzima tanto de la suspensión como del sobrenadante, mediante el ensayo de actividad hacia la hidrólisis del acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPA). También se preparó en todos los casos un blanco con la misma cantidad de enzima y sin sólido para comprobar que la enzima no pierde actividad durante el tiempo que dura la síntesis. Una vez el contenido de lipasa en el sobrenadante se mantuvo constante, se filtró la suspensión y lavó dos veces con acetona. Por último se dejó secar el sólido a temperatura ambiente y se pesó.

4.5.- MEDIDA DE ACTIVIDAD HACIA LA HIDRÓLISIS DE *p*-NPA.

Este ensayo se emplea como método rutinario para monitorizar la incorporación de la lipasa en soportes debido a la facilidad con la que se conduce espectrofotométricamente. Los experimentos se desarrollaron en un espectrofotómetro Kontron equipado con dispositivo de agitación y control de temperatura. En la cubeta se vierten 1,9 mL de la solución de sustrato (*p*-NPA 0,4 mM disuelto en tampón fosfato 50 mM a pH 7). Las disoluciones de la suspensión y del sobrenadante se diluyen en el mismo tampón del que procedan hasta alcanzar valores medibles de actividad. Estas muestras diluidas se añaden directamente a la cubeta conteniendo los 1,9 mL de sustrato y se sigue la hidrólisis (aumento de absorbancia por minuto) a una longitud de onda de 348 nm y 25°C.

4.6.- MEDIDA DE ACTIVIDAD HACIA LA HIDRÓLISIS DE ABTS

Este método espectrofotométrico fue el escogido para monitorizar la incorporación de PPO y HRP a los soportes. El espectrofotómetro empleado es el mismo que en la sección anterior.

En el caso de la PPO, se vierten en la cubeta 1,9 mL de 1,2'-(azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-acido sulfúrico (ABTS) 1mM diluido en tampón acetato 100mM a pH=4,5. En caso necesario, las disoluciones de sobrenadante o suspensión, según el caso, se diluyen el mismo tampón acetato hasta alcanzar valores medibles. Finalmente, 0,1mL de estas mezclas diluidas se añaden a la cubeta, y se monitoriza el aumento de absorbancia por minuto a una longitud de onda de 436nm.

Para el ensayo con HRP, se vierten en la cubeta 1,9 mL de una disolución de ABTS en tampón fosfato 10mM a pH 6 y en presencia de H₂O₂ al 1%. La composición utilizada es 17μl H₂O₂ : 22,5 mL tampón : 2,5 mL ABTS. A esta mezcla se añaden 0,05 mL de la muestra diluida de suspensión o sobrenadante y se mide el aumento de absorbancia por minuto a una longitud de onda de 414 nm.

4.7.- ESTUDIOS DE LIXIVIADO EN MEDIO ACUOSO.

Estos experimentos se han realizado suspendiendo el sólido con la enzima inmovilizada en medio acuoso, concretamente en tampón fosfato 50 mM a pH 7. La relación sólido/líquido escogida es de 1,25 mg solido/mL tampón, lo que implica que el medio está cuatro veces más diluido que al preparar las inmovilizaciones. De este modo estamos forzando las condiciones para facilitar la salida de la lipasa. La cantidad de enzima lixiviada se midió aplicando el método de Bradford al sobrenadante a diferentes tiempos entre 1 y 120 minutos. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 7, por encima de los pI tanto de la sílice como de la lipasa, con el objetivo de generar repulsión de cargas de la enzima con el soporte.

4.8.- MEDIDA DE ACTIVIDAD HACIA LA HIDRÓLISIS DE TRIBUTIRINA.

La actividad catalítica de los derivados de lipasa hacia la hidrólisis de tributirina se midió añadiendo 1,47 mL de tributirina (TB) sobre 48,5 mL de tampón fosfato potásico 10 mM y se incuban a 25°C. Sobre esta mezcla se añaden 5 mg de catalizador. La

velocidad de hidrólisis se mide por valoración con NaOH 100 mM en un valorador automático Mettler Toledo DL50, que valora el ácido butírico liberado durante la reacción para mantener un pH constante de 7,0. Una unidad de actividad corresponde a la hidrólisis de 1 μ mol de tributirina por minuto.

4.9.- CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) mide la cantidad de calor que es necesario aplicar a una muestra para mantener una rampa de temperatura determinada, siempre en relación a una muestra de referencia. Así, cuando la muestra sufre un proceso físico como es una transición de fase, requiere un aporte de calor superior al requerido por la muestra de referencia si el proceso es endotérmico. Por el contrario, si éste es exotérmico, el calor necesario será menor. El resultado del proceso es un termograma, que refleja la diferencia de calor aportado a ambas muestras en función de la temperatura.

Las transiciones de fase se identifican como picos en el termograma, pudiéndose identificar tanto la temperatura a la que tienen lugar como la entalpía del proceso. Al ser la micelación de surfactantes (transición de unímero a micela circular) un proceso endotérmico, el termograma muestra un pico ascendente a una temperatura que se denomina Temperatura Micelar Crítica (CMT).

En nuestro caso, las medidas fueron tomadas en un aparato calorímetro diferencial de barrido de alta sensibilidad Microcal VP-DSC). El volumen de muestra fue de 0,5 mL. Los termogramas se grabaron para disoluciones de Pluronic 2,5% w/v, con y sin lipasa en una concentración de 1 mg/mL. La referencia fue agua destilada en todos los casos. Se cubrió un rango de temperaturas de 10 a 90 °C a una velocidad de 1°C/min. La CMT se calculó en el punto inicial del pico endotérmico asociado a la transición.

5.- RESUMEN DE RESULTADOS

En esta sección se presenta una discusión de los principales resultados obtenidos durante el desarrollo de la tesis doctoral, que aparecen recogidos en las publicaciones I a V del anexo 1. El empleo de dos estrategias contrapuestas para la encapsulación de enzimas nos conduce a dividir la sección en dos partes: inmovilización post-síntesis (artículos I y II) e inmovilización in-situ (artículos IV y V). El artículo III compila y compara algunos resultados de ambas aproximaciones.

5.1.- INMOVILIZACIÓN POST-SÍNTESIS (ARTÍCULOS I-II)

El primer objetivo planteado es estudiar de forma sistemática la influencia de los parámetros estructurales y texturales de los MMO en su comportamiento como soportes enzimáticos. La bibliografía científica ofrece gran cantidad de información al respecto, pero ésta se encuentra dispersa y está obtenida en condiciones muy variables (distintas enzimas, distintas condiciones de inmovilización, distintos materiales, etc.) lo que hace que la comparación sea casi imposible.

Para solventar esta carencia hemos preparado una batería de MMO en los que hemos variado de forma controlada varios parámetros, y que luego hemos sometido a inmovilización de lipasa de *Candida Antarctica* B (CaLB) en idénticas condiciones. Se han seleccionado de entre la numerosa bibliografía los materiales más representativos y reproducibles, tratando de cubrir los principales tipos de estructuras. Se han empleado tanto materiales con poros del tipo canal (SBA-15 y KIT-6) como con poros del tipo caja. Los materiales finalmente utilizados, así como su estructura tridimensional de poros, se muestran en la figura 4:

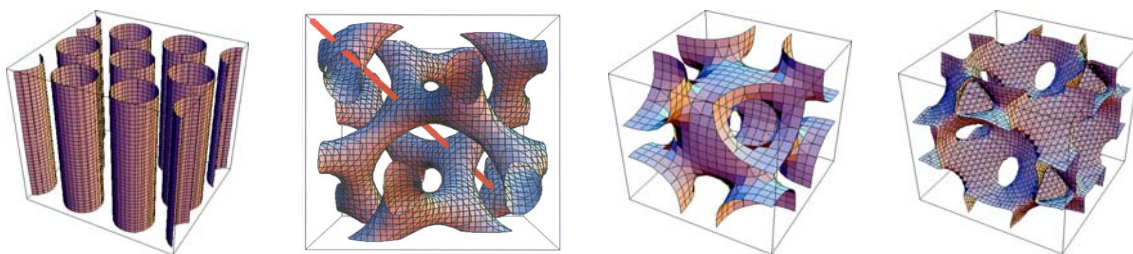


Figura 4: los tres métodos para sintetizar MMO híbridos orgánico-inorgánicos. De izquierda a derecha: SBA-15 ($p6mm$), KIT-6 ($Ia3d$), SBA-16 ($Im3m$), FDU-12 ($Fm3m$).

La exhaustiva caracterización de los materiales soporte por una amplia variedad de técnicas (recogida de forma detallado en el artículo I, tanto en el cuerpo principal como

en la información suplementaria) permite el conocimiento preciso de aquellas características cuya influencia en la inmovilización deseamos estudiar. En este sentido se le concede especial importancia a las propiedades texturales, particularmente al tamaño de poro. Éste se obtiene generalmente aplicando el modelo BJH a la rama de adsorción de las isotermas de adsorción de N_2 , aunque está bien documentado que este método subestima los diámetros de poro⁷⁰.

En el caso de los materiales con poros del tipo caja y ventana esta aproximación es aún más deficitaria, pues además de subestimar los tamaños de las cajas en mayor medida, no ofrece garantías en el cálculo de los tamaños de las ventanas de entrada. Para intentar suplir esta falta de datos, en algunos casos (materiales SBA-16 y Me-SBA-16) se ha podido aplicar una novedosa técnica de reconstrucción tridimensional a partir de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión, obteniendo resultados fiables para ambas dimensiones⁷¹.

Al abordar la inmovilización de enzimas en OMM, y como ya se comentó en la introducción, la principal restricción que se debe superar es el hecho de que los tamaños de poro suelen tener dimensiones sólo algo superiores a los de la propia enzima que se pretende alojar en su interior, en nuestro caso lipasa. Esto plantea a priori el problema de la difusión de la enzima a través de los poros. Según trabajos publicados anteriormente con soportes amorfos⁴⁹, (vidrios con tamaño de poro controlado) es necesario un tamaño de poro al menos cuatro o cinco veces mayor que el de la enzima para eludir el efecto limitante de la difusión sobre la carga enzimática máxima.

Nuestros resultados (que se resumen en la tabla número 1 y se detallan en el artículo I) apuntan que esta relación no es necesaria con este tipo de materiales, sino que las restricciones al acceso de la enzima desaparecen cuando el tamaño de poro es unas dos veces su diámetro. Esto se evidencia por la casi idéntica carga enzimática (y tiempo de contacto necesario para lograrla) de la sílice amorfa usada como material de referencia (diámetro de poro de 27.9 nm) con respecto a la SBA-15, con diámetro de 8.8 nm (ver tabla 1). La explicación a esta discrepancia podría ser el menor tamaño de partícula de nuestras muestras (1-10 μm) respecto a las del mencionado del estudio de Bosley y Clayton⁴⁹ (50-500 μm). Sin embargo, otros factores como la conectividad de la red porosa, el volumen o la superficie de poro no parecen ejercer influencia en los

resultados

Como se comentó en la introducción, las lipasas son enzimas susceptibles de interacción hidrofóbica, por lo que otra variación que se ha introducido en los materiales es la presencia de una ligera hidrofobicidad en sus paredes. Esto se ha conseguido por medio de la funcionalización de las paredes silíceas con grupos metilo (en un porcentaje molar de 5-10%) mediante la técnica de co-condensación²⁰. La incorporación de la función metilo se ha corroborado mediante RMN de Si, observándose que se ha logrado el cambio químico de la superficie manteniendo al estructura ordenada.

No obstante, esta ligera hidrofobicidad parece ser demasiado débil para favorecer la interacción hidrofóbica, mientras que la reducción adicional de los tamaños de poro genera una caída de las cargas finales. En este sentido, y para completar esta parte del estudio, hemos ido un paso más allá logrando la incorporación de mayor grado de hidrofobicidad en los MMO (artículo II). Esto lo hemos conseguido mediante la inclusión de grupos orgánicos en el propio esqueleto mediante el uso de 100% de organosilanos como precursores silíceos. Esto permite, por un lado, introducir una hidrofobicidad mucho mayor que mediante el simple anclaje de grupos funcionales, y por otro hacerlo sin reducir el diámetro efectivo de poro (ver tabla 1). Como se comentó en la introducción, estos materiales son lo que en la bibliografía se conoce como organosílices periódicas mesoporosas (OPM).

Así, hemos sintetizado un OPM con similares características texturales y estructurales al SBA-15 (con el fin de descartar su efecto en el proceso) mediante el empleo de bis(triethoxisilil)etano como precursor. Esto genera paredes en las que los átomos de silicio se alternan con los de carbono en una proporción de 1:1, lo que les confiere gran hidrofobicidad. Este material se ha analizado mediante las mismas técnicas de caracterización que los MMO, y se han sometido a inmovilización de lipasa también en idénticas condiciones. Los resultados, resumidos en a tabla 1, se comparan con los de la Me-SBA-15 y con los de sílices amorfas de gran tamaño de poro, en forma pura y funcionalizadas con grupos octilo (artículo II).

La caracterización de los materiales corrobora la estructura tipo SBA-15, con simetría plana $p6mm$, del OPM. La incorporación de los grupos orgánicos también se comprueba con RMN de ^{29}Si , y sus propiedades texturales se deducen a partir de las

isotermas de adsorción de N₂, obteniéndose diámetros de poro algo inferiores pero similares a los de SBA-15 y Me-SBA-15 (todos ellos en torno a 8 nm). Las sílices amorfas, por el contrario, tienen diámetros de más de 20 nm, con una considerable reducción en el caso de las muestras funcionalizadas.

Los resultados de la inmovilización (ver tabla 1) muestran como las sílices amorfas hidrofobizadas con grupos octilo pueden alojar una carga enzimática muy alta (200-400 mg/g). Las muestras SBA-15 y Me-SBA-15 quedan muy por debajo, con cargas unas 10 veces inferiores. La menor carga de la muestra metilada, ya reportada y comentada en el artículo I, es de nuevo debida a que la pequeña hidrofobicidad de los grupos metilo no compensa la reducción de tamaño de poro, que dificulta la difusión de la enzima a través de la red porosa. En cambio, el material OPM, con un tamaño de poro algo inferior a las dos SBA-15 pero hidrofobicidad mucho mayor, sí que permite obtener cargas prometedoramente altas (91 mg/g). La estrategia perseguida ha funcionado correctamente, y esta vez la influencia positiva de la alta hidrofobicidad se ha hecho evidente. La mayor carga de las sílices amorfas se explica tan sólo por su mayor tamaño de poro.

Material	D _p (nm) ^a	S _p (m ² /g)	Carga enzimática (mg/g) ^b	Tiempo de contacto (min)	Actividad específica (U/mg enz.) ^c
SBA-15	8,8	890,3	44	120	60
Me-SBA-15	7,9	793,7	23	200	88
KIT-6	8,4	917	37	280	66
Me-KIT-6	7,7	984	35	50	82
OPM	7,1	960	91	60	202
SA	27,9	305	45	120	100
Oct-SA-Et	23	264	400	60	80
Oct-SA-Met	23,6	294	200	60	83

a Medido mediante el método BJH.

b Medida en miligramos de enzima por gramo de sólido.

c Medida en unidades de tributirina convertidas por cada miligramo de enzima presente en el interior del material.

Tabla 1: resumen de resultados con materiales con poros del tipo canal hidrofobizados.

El anclaje de la enzima sobre los soportes no hidrofóbicos se realiza por medio de interacciones electrostáticas débiles, logradas mediante la suspensión en un medio acuoso a un pH de 5, entre los puntos isoeléctricos de enzima y sílice, de manera estos que presentan cargas opuestas. Por tanto, es de esperar que la retención en el interior de la red porosa no sea irreversible. El lixiviado de enzima del interior de los materiales se

estudia, tal como se comentó en la sección 4.7, suspendiendo los materiales con la enzima inmovilizada en medio acuoso a un pH por encima del pI tanto de la enzima como de la sílice, de modo que ambas especies tienen una carga neta negativa y hay repulsión entre ellas. Los resultados del artículo I muestran que los dos materiales que no ofrecían problemas difusionales para la entrada de la lipasa (SA y SBA-15) tampoco lo ofrecen a su salida, con un perfil de lixiviado que no alcanza un máximo en el rango de tiempo estudiado (ver figura 5). Con todo, el lixiviado es más rápido en la sílice amorfa. El resto de materiales muestran un perfil de lixiviado con saturación, alcanzándose un máximo que ya no se supera por más que se mantenga la suspensión. Los resultados parecen mostrar que los factores cuya influencia no era visible en la inmovilización (tortuosidad o presencia de grupos metilo) sí lo es ahora, probablemente como consecuencia de la estabilización de la lipasa en el interior de los canales, lo que favorece su interacción con las paredes. En cuanto a la hidrofobicidad, los resultados del artículo II muestran que el lixiviado es mucho menor en el caso de las sílices amorfas octiladas que en la Me-SBA-15 y OPM. El lixiviado de la enzima del interior de las OPM se reduce drásticamente cuanto se aumenta la concentración del catalizador.

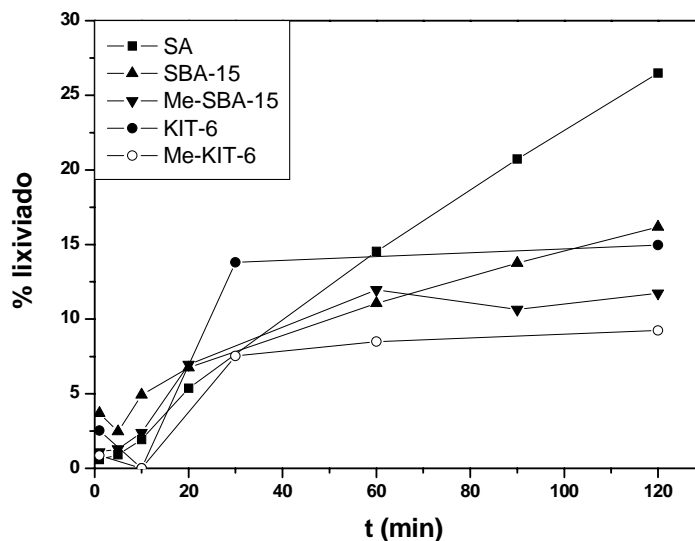


Figura 5: lixiviado de enzima con materiales con poros del tipo canal hidrofobizados.

Por último, se estudió la actividad enzimática de los biocatalizadores soportados hacia la reacción de hidrólisis de tributirato de glicerilo o tributirina (ver tabla 1). Los resultados muestran (artículo I) como los materiales funcionalizados con grupos metilo presentan mayor actividad específica (medida en unidades de tributirina hidrolizada por miligramo de enzima soportada). Esto se explica debido a la mejor difusión del sustrato,

altamente hidrofóbico, a lo largo de los canales del material metilado, algo que ya se había documentado con anterioridad⁷². Más aún, al estudiar la actividad específica del OPM (artículo II) obtenemos los valores aún más altos de todas las muestras probadas, más del doble que las sílices amorfas funcionalizadas. Probablemente esto se debe, por un lado, a su mayor hidrofobicidad, y por otro a la mejor conectividad de su red porosa, que hace que la difusión de sustratos y productos (de tamaño muy inferior al diámetro de poro) sea más sencilla, lo que debería aumentar la velocidad de reacción global y por tanto la eficiencia.

Los mismos experimentos fueron llevados a cabo con los materiales del tipo caja y ventana (SBA-16, Me SBA-16, FDU-12 y Me-FDU-12) para medir la carga enzimática obtenida, el lixiviado de lipasa en medio acuoso y la actividad hacia la hidrólisis de la tributirina (artículo I). Los resultados se resumen en la tabla 2 y en la figura 6. En cuanto a la carga enzimática ésta es, en general, menor que en los materiales con poros cilíndricos, y se necesita mayor tiempo de contacto para lograrlas. Esto se explica por los pequeños tamaños de las ventanas de acceso, que, en los casos en los que se conocen de forma incontrovertible (SBA-16 y Me-SBA-16) están en el rango de las propias dimensiones de la enzima, por lo que su difusión a lo largo de la red porosa está muy impedida.

El contrapunto positivo a este hecho es el pequeño porcentaje de enzima lixiviada, muy inferior al de sus análogos cilíndricos. En general se observa de nuevo como, a mayor tamaño de poro, mayor es la cantidad de enzima que lixivía. Concretamente en el caso de SBA-16 únicamente se observa el lixiviado en los primeros 20 minutos de incubación (ver figura 6), permaneciendo constante la cantidad de proteína soluble a partir de este momento, lo que parece indicar que el lixiviado podría deberse a una población de moléculas de enzima que no esté perfectamente atrapada en el interior de las cajas. Este hecho es de crucial importancia, pues puede llevar a la encapsulación irreversible de la enzima en el interior de las cajas sin necesidad de utilizar enlaces covalentes.

Material	D _p (nm) ^a	D _p (nm) ^b	S _p (m ² /g)	Carga enzimática (mg/g) ^b	Tiempo de contacto (min)	Actividad específica (U/mg enz.) ^c
SBA-16	10,2	12,3 (4,6)	659	5	1440	72
Me-SBA-16	8,8	13,1 (5,9)	508	30	1440	77
FDU-12	10,4	-	261	28	1440	79
Me-FDU-12	9,7	-	628	37	10	110

^a Medido mediante el método BJH.

^b Extraído de la reconstrucción tridimensional. Entre paréntesis el tamaño de las ventanas.

^c Medida en unidades de tributirina convertidas por cada miligramo de enzima presente en el interior del material.

Tabla 2: resumen de resultados con materiales con poros del tipo caja hidrofobizados.

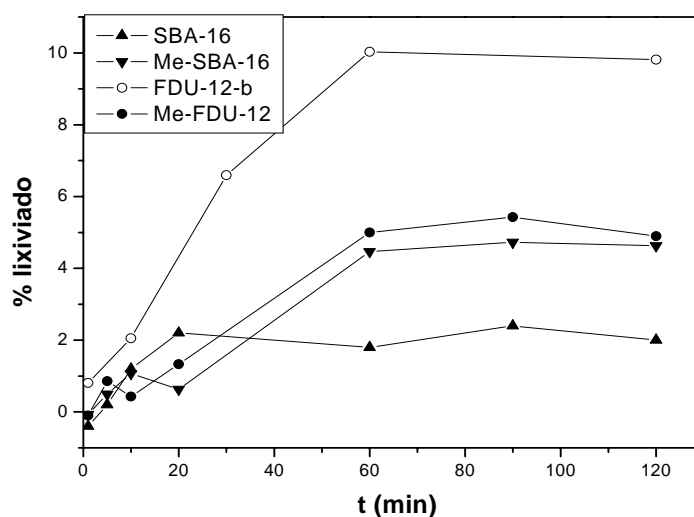


Figura 6: lixiviado de enzimas con materiales con poros del tipo caja hidrofobizados.

El material Me-FDU-12, sintetizado con el porcentaje más alto de grupos metilo, presenta características algo distintas a los de sus análogos. Su estructura no presenta orden a largo alcance, y se lo podría describir como un material mesoporoso formado por cajas desordenadas que lleva a una conectividad regular, conocido en la literatura como *mesocellular foam*. Esto se traduce en mayor carga y actividad enzimática, pero mayor lixiviado de la enzima de su interior, probablemente como resultado de la poca conectividad de las aberturas exteriores con el núcleo de las partículas.

Tenemos, por tanto, que los materiales con poros del tipo caja y ventana dificultan enormemente el lixiviado de la enzima del interior de la estructura porosa, lo que sería una gran ventaja de cara a aplicaciones industriales en las que se requieran materiales que soporten un número elevado de ciclos de reacción sin perder actividad. Sin

embargo, para resultar aplicables este tipo de soportes deberían admitir una cantidad mayor de lipasa en su interior. Es por ello que sería deseable un método que permitiera introducir la enzima en las cajas de la red porosa sin necesidad de hacerla difundir a través de las ventanas, de tamaño demasiado reducido. Esto nos lleva a la siguiente etapa de nuestro estudio: la encapsulación in-situ (es decir, durante la propia síntesis) de lipasa en materiales mesoporosos ordenados.

5.2.- INMOVILIZACIÓN IN-SITU (ARTÍCULOS III-V)

Los surfactantes elegidos para ese fin son los co-polímeros de tres bloques, de tipo no iónico (los más comunes en la bibliografía en los últimos años), pues como se comentó en secciones anteriores se ha documentado que los de tipo catiónico pueden inhibir la actividad lipolítica de la enzima⁵⁹, además de que conducen a materiales con poros demasiado pequeños. Sin embargo, y como ya se comentó en la introducción, las condiciones habituales de síntesis con este tipo de surfactantes son poco compatibles con la estabilidad de las lipasas convencionales, por lo que fue necesario modificarlas. El pH, que habitualmente es inferior a 1 y en ocasiones llega a valores negativos, fue modificado hasta un valor de 3.5. También se prescindió del tratamiento hidrotermal a alta temperatura que suele seguir a la fase de condensación inicial. Para compensar la suavidad de las condiciones añadimos distintas cantidades de sales inorgánicas, concretamente KCl, que es capaz de promover la interacción del surfactante y los precursores silíceos, aportando un mayor grado de ordenamiento al material final⁷³.

La interacción de la lipasa con los surfactantes no iónicos fue previamente estudiada por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Así se pudo observar que la Temperatura Micelar Crítica (CMT) del surfactante se reducía cuando se añadía lipasa a la disolución, siendo este desplazamiento mayor cuanto mayor era la hidrofobicidad del surfactante. Estos datos indican que la lipasa interacciona más intensamente con los surfactantes más hidrofóbicos, confirmando así la interacción de la región hidrofóbica de la lipasa con las cadenas de OPP de los surfactantes. De hecho, la presencia de lipasa parece tener algún tipo de efecto en el proceso de co-ensamblaje entre las moléculas de surfactante para formar micelas, y como consecuencia con la sílice, pues en su ausencia el material tarda mucho más en precipitar.

El estudio de los materiales finales por DRX, TEM e isothermas de adsorción de N₂ confirma la existencia de los mismos tipos de estructura que los materiales de referencia sintetizados en condiciones mucho más rigurosas. Los resultados se resumen en la tabla 3. Cuando el surfactante empleado es P123, el resultado son materiales con estructura plana hexagonal y poros del tipo canal (tipo SBA-15); cuando se emplea F127 como agente director de estructura, se generan materiales con poros del tipo caja y estructura cúbica centrada en las caras (tipo FDU-12). Los materiales del primer tipo fueron denotados como E-P123 o E-P123-S (según la cantidad de sal incorporada a la síntesis), y los de segundo tipo como E-F127, E-F127-S1 y E-F127-S2. En el caso de las muestras tipo E-F127, el grado de orden es mayor cuando lo es la cantidad de enzima, mientras que ocurre lo contrario en las del tipo E-P123. La síntesis, por tanto, ha sido un éxito pese a la suavidad de las condiciones y la presencia de extracto enzimático, lo que ya de por sí es un hallazgo valioso. Sin embargo falta por comprobar si hemos conseguido nuestro objetivo principal: retener la enzima en el interior de los MMO manteniendo al mismo tiempo su actividad catalítica.

Material	Surfactante	[M] _{KCl}	Estructura	D _p (nm) ^a	S _p (m ² /g)
E-P123	P123	0	<i>p6mm</i>	5,5	423
E-P123-S	P123	0,5	<i>p6mm</i>	5,8	141
E-F127	F-127	0	<i>Fm$\bar{3}$m</i>	4,6	338
E-F127-S1	F-127	1	<i>Fm$\bar{3}$m</i>	5,0	320
E-F127-S2	F-127	1,5	<i>Fm$\bar{3}$m</i>	5,4	443

a Tamaño del canal o de la caja, medido mediante el método BJH.

Tabla 3: MMO sintetizados en presencia de lipasa.

La cantidad de enzima encapsulada en todos los materiales de este tipo es significativamente alta, alcanzando valores hasta un 100% superiores a los de la inmovilización post-síntesis (ver tabla 4). Más aún, la eficiencia catalítica hacia la hidrólisis de tributirina (tanto cuando los materiales mantienen el surfactante en su interior como en el caso de las muestras sometidas a proceso de extracción) es también muy superior, lo que unido a la alta carga resulta en actividades globales significativamente altas. Las muestras tipo E-F127 fueron sometidas a extracción del surfactante en medio ácido suave y posteriormente probadas en los mismos tests catalíticos, obteniéndose actividades prácticamente idénticas. Esto demuestra que es posible eliminar el surfactante sin apenas afectar a la actividad de la lipasa, aunque con vistas a algunas aplicaciones este paso no parece necesario⁶².

Material	Carga enzimática (mg/g) ^b	Actividad específica (U/mg enz.) ^c	Enzima lixiviada (%) ^a
E-P123	22	98	27
E-P123-S	43	59	16
E-F127	35	106	11
E-F127-S1	93	108	12
E-F127-S2	81	119	14

^a % de la enzima inicial lixiviada después de dos horas en medio acuoso.

Tabla 4: resultados de la inmovilización in-situ de lipasa en MMO.

Por último se intentó comprobar si el confinamiento de la enzima en el interior de las cajas es efectivo a la hora de evitar su lixiviado en medio acuoso. Los resultados (ver tabla 4) muestran que un pequeño porcentaje de enzima lixivia en los momentos iniciales (probablemente la parte adsorbida superficialmente, especialmente significativa si tenemos en cuenta el pequeño tamaño de las partículas) alcanzándose rápidamente la estabilidad.

De forma adicional, se sometieron los biocatalizadores inmovilizadores a ciclos de reacción hacia la hidrólisis de tributirina. Tras 30 minutos de reacción, durante los cuales la actividad se mantiene constante (lo que indica que la mayoría de la enzima se mantiene en el interior de la estructura mesoporosa) se recupera el sólido mediante filtrado, se lava con acetona, se seca y se somete a un nuevo ciclo en idénticas condiciones. Los resultados muestran que después de dos ciclos se mantiene más del 80% de la actividad inicial, mientras que la estructura ordenada permanece intacta. La actividad perdida se debe probablemente al lixiviado de la enzima atrapada en la superficie externa o en los poros más superficiales. La estabilidad del catalizador a largo plazo en condiciones reales debe ser confirmada en estudios posteriores.

Estamos, por tanto, ante el primer paso hacia una encapsulación eficiente de enzimas en el interior de nanocajas estructuradas, o lo que es lo mismo, ante el diseño de bionanorreactores.

El último paso del estudio consiste en examinar la posible extensión de esta estrategia hacia otros sistemas enzimáticos. Para ello se han aplicado las condiciones de la síntesis con CaLB a otros dos sistemas enzimáticos de interés: PPO y HRP (artículo VI). La cantidad de KCl incorporada al gel de síntesis es 0,5 M, la menor de las empleadas con lipasa. Los resultados, tanto en la formación de una estructura

mesoporosa ordenada como en lo que se refiere a la incorporación de enzima al interior del material, se resumen en la tabla 5. PPO* y HRP* denotan a las enzimas puras empleadas en forma liofilizada, mientras que PPO y HRP se refieren a extractos enzimáticos crudos que incluyen estabilizantes:

Enzima	CaLB	PPO	PPO*	HRP	HRP*
Estructura	Fm3m con intercrecimientos hexagonales	Fm3m	Material no mesoporoso	MCF	Material no mesoporoso
Incorporación de enzima	Sí	No	No	Sí	No

Tabla 5: resultados de la incorporación de varias enzimas en la síntesis de MMO.

A la vista de los resultados, es fácil observar que los mejores resultados se han obtenido con la enzima CaLB, la ya probada anteriormente. Todos los demás sistemas sílice-enzima fallan bien a la hora de proporcionar un MMO, bien en la incorporación de enzima en la estructura, o bien en ambos aspectos.

La enzima PPO no se incorpora a los materiales en ninguno de los casos. Sin embargo, cuando es usada en forma cruda el resultados son muestras ordenadas tipo FDU-12. El empleo de la enzima en forma pura genera un material sin mesoporosidad.

La HRP, por otro lado, se incorpora al sólido sólo si es usada en forma de extracto crudo, aunque aún en ese caso la estructura porosa no es ordenada, sino tipo *mesocelular foam*. De nuevo, el empleo de enzima pura tiene como resultado material sin mesoporosidad.

Para explicar estos resultados acudimos al punto de partida en que se basó la estrategia de encapsulación in-situ: la hidrofobicidad de la enzima. PPO y HRP carecen de la región hidrofóbica externa que caracteriza a la lipasa, y que a la vista de los resultados parece ser la responsable principal de la aglomeración de las micelas y de la incorporación de la proteína al material final. Esto confirma nuestra hipótesis inicial de trabajo. La presencia de algunos estabilizantes en los extractos enzimáticos crudos podría ser responsable de promover la interacción, lo que conduce a que las muestras con HRP y PPO resulten en materiales más estructurados que cuando no hay estabilizantes en el medio. Asimismo, la incorporación de HRP en el material se relaciona con su pI (7.2) que hace que al pH de trabajo esté cargada positivamente, lo que podría generar una contribución de las fuerzas electrostáticas al proceso. No obstante, en esta etapa tan temprana de las investigaciones con esta enzima es aún difícil

afirmar cuál es la distribución de la enzima sobre este complejo material.

Por último, y en colaboración con el Profesor José Losada, de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales en la Universidad Politécnica de Madrid, se han empleado los materiales con HRP inmovilizada como biosensores para la detección de fenoles en aguas. Se han empleado y comparado los dos tipos de MMO con la enzima inmovilizada: los preparados mediante inmovilizada *in-situ*, que cuentan con la enzima atrapada y aislada en el interior de las cajas que conforman la red porosa (y cuya preparación se ha comentado en esta misma sección) y los preparados mediante inmovilización por anclaje sobre MMO con poros del tipo cilíndrico (SBA-15). El resultado son dos tipos de inmovilización y por tanto dos respuestas electroquímicas diferentes.

En el caso de los materiales con enzima inmovilizada *post-síntesis*, se obtienen dos tipos de respuesta distinta:

- a) una correspondiente a una HRP en contacto directo con el electrodo y que no precisa mediadores, permitiendo el tránsito directo de electrones al electrodo y siendo responsables de una señal de voltaje independiente. Probablemente se debe a las moléculas de HRP inmovilizadas cerca de la entrada de los poros, en la región más superficial de las partículas, que pueden contactar directamente con el electrodo. También es posible que proceda parcialmente de moléculas que lixivian al preparar el electrodo, por lo que no son enzimas inmovilizadas estrictamente hablando.
- b) otra correspondiente a una HRP que sólo es activa en presencia de mediadores, en nuestro caso el fenol. Se trata de la enzima inmovilizada en la parte interna de los canales, quedando aislada electroquímicamente del medio externo mediante la sílice. Sin embargo, al añadir el fenol como mediador se observa la respuesta electroquímica esperada. Esto demuestra que la enzima permanece activa en el interior de los canales, si bien el hecho de que se obtenga respuesta proveniente de dos tipos de enzimas distintas (desde el punto de vista electroquímico) indica que el proceso no resulta totalmente selectivo.

Sin embargo, en soportes preparados por inmovilización *in-situ* sólo se observa señal al añadir el mediador fenólico. Esta señal corresponde a la HRP atrapada de forma

eficiente en el interior de las cajas internas, y de esta manera aislada completamente del medio externo. La obtención de señal electroquímica confirma que la enzima ha mantenido su actividad durante el proceso, y la ausencia de señal sin presencia de mediadores apunta a que la inmovilización ha sido selectiva y el aislamiento de la enzima es total.

Aunque estos resultados son sólo preliminares, constituyen un primer paso hacia el objetivo final de todas estas investigaciones: la creación de una estrategia general que permita encapsular enzimas de todo tipo en el interior de materiales mesoporosos ordenados de forma irreversible.

6.- CONCLUSIONES

En este trabajo se ha pretendido arrojar algo de luz sobre algunos aspectos que afectan a la inmovilización de enzimas en Materiales Mesoporosos Ordenados. La mayor parte del esfuerzo se ha centrado en la inmovilización de la lipasa, sin perder de vista la extensión de las técnicas más exitosas a otras enzimas de interés.

En primer lugar se ha establecido la influencia de parámetros texturales y/o químicos de los MMO sobre la inmovilización, mostrando como tanto el tamaño como la forma de los poros es un factor fundamental a la hora de asegurar el éxito del proceso.

Así, en los poros de tipo canal a partir de unos 9 nm de diámetro no se aprecian restricciones a la difusión de la enzima para su inmovilización, como tampoco las hay para su lixiviado. De este modo se han alcanzado cargas enzimáticas de 44 mg/g en tiempos de inmovilización relativamente cortos (120 minutos) sobre el material SBA-15, el que arroja los mejores resultados dentro de este tipo de MMO. Sin embargo, en los poros de morfología tipo caja y ventana la inmovilización está muy restringida por el difícil acceso del enzima al interior de la red, lo que a su vez reduce en gran medida el lixiviado de la enzima hacia el medio exterior. Las cargas enzimáticas alcanzadas sobre estos materiales, concretamente sobre SBA-16, fueron muy inferiores (5 mg/g) y requirieron tiempos más largos (24 horas). En cambio el lixiviado fue insignificante y producido únicamente en las primeras etapas de la incubación, lo que permite asumir que se debió a moléculas que no estaban atrapadas en el interior de las cajas.

En cuanto a los parámetros químicos, la conocida influencia de hidrofobicidad de la pared silícea sobre la inmovilización de lipasa no se pudo establecer correctamente cuando el diámetro de los poros se ve limitado por la presencia de grupos hidrofóbicos (Me-SBA-15). Sin embargo cuando grupos débilmente hidrofóbicos como son los etileno forman parte de la pared silícea (OPM) la inmovilización de la lipasa por interacción hidrofóbica dio excelentes rendimientos (91 mg/g) y los biocatalizadores obtenidos mostraron también muy buenos valores de eficiencia catalítica (202 U/mg enzima).

La segunda parte de la tesis se ha dedicado a sintetizar MMO en los que la enzima se incorpore a los mesoporosos durante la propia síntesis. Es lo que se llama inmovilización *in-situ* de la enzima en el MMO. Tras un exhaustivo estudio de las condiciones de síntesis, modificando las mismas para hacerlas más suaves, se ha

alcanzado el objetivo de obtener MMO de tipo caja y ventana con la enzima atrapada en el interior del material y sin posibilidad de salida. Estos biocatalizadores nanoestructurados, descritos por primera vez en la literatura científica, presentan unos buenos valores de carga enzimática (hasta 93 mg/g), y el lixiviado es muy reducido. La enzima atrapada en el interior mantiene su actividad, mostrando una eficiencia catalítica superior a los biocatalizadores obtenidos por inmovilización post-síntesis (de entre 59 a 119 U/mg frente a entre 60 y 88 U/mg respectivamente). Además, es incluso posible extraer el surfactante manteniendo la actividad catalítica.

Una vez probado su éxito con la lipasa, esta estrategia se ha aplicado a otras enzimas como la PPO, GOX o HRP. En ningún caso se han podido reproducir los resultados obtenidos con lipasa: atrapamiento de la enzima en un material ordenado. Solo en el caso de la HRP se alcanzó el atrapamiento, aunque el material obtenido no es propiamente ordenado sino que constituye lo que en la bibliografía se llama *mesocelular foams*, la enzima sí que se incorpora al interior de los poros.

El hecho de que solo la lipasa presente una zona hidrofóbica sobre su superficie contribuyendo a la formación de las micelas a su alrededor parece ser el principal responsable de estos resultados contradictorios. Con estos resultados, queda abierto un campo de investigación en el que el estudio de variables en estas técnicas permita su aplicación a diversas enzimas, y el uso de los materiales resultantes en las más variadas aplicaciones.

7.- REFERENCIAS

-
- ¹ F. Rey, J. L. Jordá, *Materiales Zeolíticos: Síntesis, Propiedades y Aplicaciones* (García Martínez, J.; Pérez-Pariente, J. eds.); 2002; Publicaciones Universidad de Alicante; pág 42.
- ² A. Corma, *Chem. Rev.* 97 (1997) 2373.
- ³ J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T-X. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins, J. L. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834.
- ⁴ T. S. Yanagisama, T. Shimizu, K. Kuroda, Ch. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63 (1990) 988.
- ⁵ S. Inagaki, Y. Fukushima, K. Kuroda, *Chem. Común.* (1993) 680.
- ⁶ G. S. Attard, J. C. Glyde, C. G. Goltner, *Nature* 378 (1995) 366.
- ⁷ Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, D. G. Demuth, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B. F. Chmelka, F. Schüth, G. D. Stucky, *Chem. Mater.* 6 (1994) 1176.
- ⁸ A. Firouzi, D. Kumar, L. M. Bull, T. Besier, P. Sieger, Q. Huo, S. A. Walker, J. A. Zasadzinsky, C. Glinka, J. Nicol, D. Margolesse, G. D. Stucky, B. F. Chmelka, *Science* 267 (1995) 1138.
- ⁹ C. Y. Chen, S. Q. Xiao, M. E. Davis, *Microporous Mater.* 4 (1995) 1.
- ¹⁰ Z. Y. Yuan, W. Z. Zhou, *Chem. Phys. Lett.* 333 (2001) 427.
- ¹¹ D. Y. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 6024.
- ¹² D. Y. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* 279 (1998) 548.
- ¹³ F. Kleitz, D. Liu, G. M. Anilkumar, I. S. Park, L. A. Solovyov, A. N. Shmakov, R. Ryoo, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 14296.
- ¹⁴ J. R. Matos, M. Kruk, L. P. Mercuri, M. Jaroniec, L. Zhao, T. Kamiyama, O. Terasaki, T. J. Pinnavaia, Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 821.

-
- ¹⁵ J. Fan, C.Z. Yu, T. Gao, J. Lei, B.Z. Tian, L.M. Wang, Q. Luo, B. Tu, W.Z. Zhou, D.Y. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 3146.
- ¹⁶ T.W. Kim, R. Ryoo, M. Kruk, K. P. Gierszal, M. Jaroniec, S. Kamiya, O. Terasaki J. *Phys. Chem. B* 108 (2004) 11480.
- ¹⁷ T. W. Kim, F. Kleitz, B. Paul, R. Ryoo, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 7601.
- ¹⁸ X. Liu, B. Tian, C. Yu, F. Gao, S. Xie, B. Tu, R. Che, L. M. Peng, D. Y. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2876.
- ¹⁹ M. H. Lim, A. Stein, *Chem. Mater.* 11 (1999) 3285.
- ²⁰ M. H. Lim, C. F. Blanford, A. Stein, *Chem. Mater.* 10 (1998) 467.
- ²¹ S. Fujita, S. Inagaki, *Chem. Mater.* 20 (2008) 891.
- ²² T. Asefa, M. J. MacLachlan, N. Coombs, G. A. Ozin, *Nature* 402 (1999) 867.
- ²³ S. Inagaki, S. Guan, Y. Fukushima, T. Ohsuna, O. Terasaki, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9611.
- ²⁴ B. J. Melde, B. T. Holland, C. F. Blanford, A. Stein, *Chem. Mater.* 11 (1999) 3302.
- ²⁵ O. Muth, C. Schellbach, M. Froba, *Chem. Commun.* (2001) 2032.
- ²⁶ W. P. Guo, J. Y. Park, M. O. Oh, H. W. Jeong, W. J. Cho, I. Kim, C. S. Ha, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2295.
- ²⁷ X. Y. Bao, X. S. Zhao, X. Li, P. A. Chia, J. Li, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 4684.
- ²⁸ X. Y. Bao, X. S. Zhao, S. Z. Qiao, S. K. Bhatia, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 16441.
- ²⁹ S. Z. Qiao, C. Z. Yu, W. Xing, Q. H. Hu, H. Djojoputro, G. Q. Lu, *Chem Mater.* 17 (2005) 6172.
- ³⁰ J. Fan, J. Lei, L. M. Wang, C. Z. Yu, B. Tu, D. Y. Zhao, *Chem. Commun.* (2003) 2140.
- ³¹ L. Zhao, G. S. Zhu, D. L. Zhang, Y. Di, Y. Chen, O. Terasaki, S. L. Qiu, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 764.
- ³² C. Li, J. Liu, X. Shi, J. Yang, Q. Yang, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 10948.

-
- ³³ R. M. Blanco, J. J. Calvete, J. M. Guisán, *Enzyme Microbial Technology* 11 (1989) 353.
- ³⁴ K. Kato, R. Irimescu, T. Saito, Y. Yokogawa, H. Takahashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2003) 203.
- ³⁵ L. Sarda, P. Desnuelle, *BBA* 30 (1958) 513.
- ³⁶ T. Gitlesen, M. Bauer, P. Adlercreutz, *BBA* 1345 (1997) 188.
- ³⁷ M. Ferrer, F. J. Plou, G. Fuentes, M. A. Cruces, L. Andersen, O. Kirk, M. Christensen, A. Ballesteros, *Biocat. And Biotrans.* 20 (2002) 63.
- ³⁸ A. Bastida, P. Sabuquillo, P. Armisen, R. Fernández-Lafuente, J. Huguet, J. M. Guisán, *Biotechnol. Bioeng.* 58 (1998) 488.
- ³⁹ U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 453.
- ⁴⁰ A. C. Pierre, *Biocatal. Biotransform.* 22 (2004), 145.
- ⁴¹ C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1451.
- ⁴² M. Ferrer, F. J. Plou, G. Fuentes, M. Angeles Cruces, L. Andersen, O. Kirk, M. Christense, A. Ballesteros, *Biocatal. Biotransform.* 20 (2002) 63.
- ⁴³ R.M. Blanco, P. Terreros, M. Fernandez-Perez, C. Otero, G. Diaz-Gonzalez, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 83.
- ⁴⁴ R.M. Blanco, P. Terreros, M. Fernandez-Perez, C. Otero, G. Diaz- Gonzalez, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 83.
- ⁴⁵ J. F. Díaz, K. J. Balkus Jr., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 2 (1996) 115.
- ⁴⁶ H. P. Yiu, P. A. Wright, *J. Mat.Chem.* 15 (2005) 3690.
- ⁴⁷ M. Hartmann, *Chem. Mater.* 17 (2005) 4577.
- ⁴⁸ S. Hudson, E. Magner, J. Cooney, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 8582.
- ⁴⁹ J. A. Bosley, J. C. Clayton, *Biotech. Bioeng.* 43 (1994) 934.

-
- ⁵⁰ A. Salis, D. Meloni, S. Ligas, M.F. Casula, M. Monduzzi, V. Solinas, E. Dumitriu, *Langmuir* 21 (2005) 5511.
- ⁵¹ K. Kato, R. Irimescu, T. Saito, Y. Yokogawa, H. Takahashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2003) 203.
- ⁵² A. Macario, V. Calabrò, S. Curcio, M. De Paola, G. Giordano, G. Iorio, A. Katovic, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 142 (2002) 1561.
- ⁵³ H. Ma, J. He, D. G. Evans, X. Duan, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 30 (2004) 209.
- ⁵⁴ J. He, Y. Xu, H. Ma, D. G. Evans, Z. Wang, X. Duan, *Micropor. Mesopor. Mater.* 94 (2006) 29.
- ⁵⁵ Y. Han, S. S. Lee, J. Y. Ying, *Chem Mater.* 18 (2006) 643.
- ⁵⁶ A. Galarneau, M. Mureseanu, S. Atger, G. Renard, F. Fajula, *New J. Chem.* 30 (2006) 562.
- ⁵⁷ M.T. Reetz, *Adv. Mater.* 9 (1997) 943.
- ⁵⁸ I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8587.
- ⁵⁹ [9] M. Mureseanu, A. Galarneau, G. Renard, F. Fajula, *Langmuir*, 21 (2005) 4648.
- ⁶⁰ Y. Wei, H. Dong, J. Xu, Q. Feng, *Chem. Phys. Chem.* 9 (2002) 802.
- ⁶¹ J.L. Blin, C. Gérardin, C. Carteret, L. Rodehüser, C. Selve, M. Stébé, *J. Chem. Mater.* 19 (2005) 1479.
- ⁶² A. Macario, M. Moliner, A. Corma, G. Giordano, *Micropor. Mesopor. Mater.* 118 (2009) 334.
- ⁶³ O. Kirk, M. W. Christensen, *Org. Process Res. Dev.* 6 (2002) 446.
- ⁶⁴ J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* 2 (1994) 293.
- ⁶⁵ H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, *Microporous Mesoporous Mater.* 44-45 (2001), 755.
- ⁶⁶ H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, *Chem. Mater.* 12 (2000) 3001.

-
- ⁶⁷ M. Boveri, J. Agúndez, I. Díaz, J. Pérez-Pariente, E. Sastre, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 68 (2003) 1914.
- ⁶⁸ I Díaz, C. Márquez-Álvarez, F. Mohino, J. Pérez-Pariente, E. Sastre, *J. Catal.* 193 (2000) 283.
- ⁶⁹ M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.
- ⁷⁰ J. R. Matos, M. Kruk, L. P. Mercuri, M. Jaroniec, L. Zhao, T. Kamiyama, O. Terasaki, T. J. Pinnavaia, Y. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 821.
- ⁷¹ Y. Sakamoto, M. Kaneda, O. Terasaki, D. Y. Zhao, J. M. Kim, G. Stucky, H. J. Shin, R. Ryoo, *Nature* 408 (2000) 449.
- ⁷² I Díaz, C. Márquez-Álvarez, F. Mohino, J. Pérez-Pariente, E. Sastre, *J. Catal.* 193 (2000) 295.
- ⁷³ C. Yu, B. Tian, J. Fan, G.D. Stucky, D. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 4556.

